PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:
2000 - 876

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7]:
G 01 N 31/16

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA

ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **09.09.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **09.09.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/9719142**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13.09.2000**
(Věstník č. 9/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/GB98/02711**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/13328**

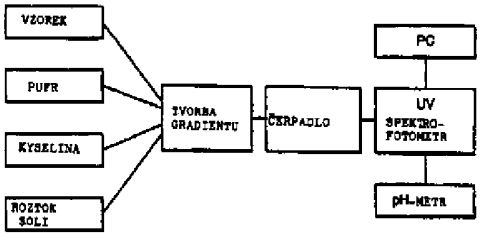
(71) Přihlašovatel:
GLAXO GROUP LIMITED, Greenford, GB;

(72) Původce:
Bevan Christopher David, Stevenage, GB;
Hill Alan Peter, Stevenage, GB;
Reynolds Derek Peter, Stevenage, GB;

(74) Zástupce:
Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Způsob kontinuální titrace a zařízení k provádění způsobu



(57) Anotace:

Způsob kontinuální titrace, při němž se nejméně jeden parametr nejméně jedné sloučeniny ve sledované směsi sleduje v průběhu změny směsi látek změnou koncentrace jedné nebo většího počtu složek této směsi, přičemž spočívá v tom, že se kontinuálně mísí nejméně dvě složky proudu kapaliny za vzniku výsledného proudu, který se nechá projít spektrofotometrickou detekční oblastí a objemový poměr nejméně dvou složek, vytvářejících výsledný proud se kontinuálně a lineárně mění v průběhu času změnou relativního poměru složek výsledného proudu, přičemž celkový objem směsi zůstává konstantní. Zařízení je tvořeno nejméně dvěma vstupy, propojenými se společným kanálem, detekční zónou, spektrofotometrickým detektorem pro monitorování proudu kapaliny v detekční zóně a řídícími prostředky pro možnost změny složení proudu v hlavním kanálu kontinuálně a lineárně v průběhu času.

CZ 2000 - 876 A3

PV 2000 – 876

Způsob kontinuální titrace a zařízení k provádění způsobu

Oblast techniky

Vynález se týká zlepšených analytických postupů ke stanovení různých látek, zvláště kontinuální titrace a také zařízení k provádění tohoto způsobu.

Dosavadní stav techniky

Řada sloučenin má fyzikálněchemické vlastnosti, které se mění v závislosti na chemickém nebo fyzikálním prostředí, které tyto látky obklopuje. Tyto vlastnosti je možno sledovat změnami prostředí a pozorováním vlivu těchto změn na zkoumané látky. Jako příklad takových vlastností lze uvést ionizační stav, rozpustnost, dělení např. mezi organickou a vodnou fázi nebo na micelly nebo liposomy, intenzitu vazby ligandu nebo kovu při tvorbě komplexu a hydrofobnost. Všechny tyto vlastnosti se mohou měnit při změně parametrů okolí, jako je pH, iontová síla nebo koncentrace některých látek v systému. Analytická chemie, která sleduje vlastnosti chemických nebo biologických molekul dlouho považovala titraci za jeden z hlavních nástrojů, kterým je možno některé parametry, např. pH roztoku sledovat tak, že se do systému po kapkách přidává jedena nebo větší počet reakčních činidel, přičemž další parametry systému zůstávají v podstatě stálé a je tedy možno izolovaně měřit účinek změn jediného parametru.

Jako příklad vlastnosti, kterou je možno stanovit titrací je hodnota pKa (dissociační konstanta) ionizovatelné skupiny ve sloučenině, tato hodnotě může být definována jako hodnota pH, při níž je skupina ionizována na 50 %. Úroveň ionizace dané ionizovatelné skupiny při jakémkoliv pH je možno přímo vypočítat, jakmile je hodnota pKa přesně známa. Daná molekula může mít řadu hodnot pKa v případě, že obsahuje více než jednu ionizovatelnou skupinu. Vzhledem k tomu, že se ionizační stav molekuly může měnit také

vlivem dalších vlastností, jako je hydrofobnost nebo rozpustnost ve vodě, je znalost hodnoty pKa pro potenciální léčiva velmi důležitá. Až dosud nebylo možno využít informaci o hodnotě pKa úplně vzhledem k obtížím, vznikajícím při tradičním provádění titrace. Dále budou probrány obecné principy a techniky, týkající se řady fyzikálněchemických vlastností pro určitou látku. V případě hodnoty pKa se bude pro jednoduchost předpokládat, že molekula obsahuje pouze jednu ionizovatelnou skupinu a má proto jen jednu hodnotu pKa, uváděné podmínky je však možno stejným způsobem aplikovat i pro molekuly s větším počtem hodnot pKa. V případě, že to bude významné, bude tato skutečnost specificky uváděna.

Obvyklé titrační postupy mají celou řadu nevýhod. Jejich provádění je pomalé a jeden pracovník může obvykle v průběhu jednoho dne zpracovat jen malý počet vzorků. Provádění zkoušky je pracné vzhledem k tomu, že po každé přidané kapce reakčního činidla je nutno vyčkat dosažení rovnovážného stavu směsi před odečtením výsledku. Přesnost běžného provádění tohoto postupu je omezena také rozměrem přidávaných kapek, který se může měnit u různých pracovníků a také koncentrace zkoumané látky se po každé přidané kapce mění vzhledem k tomu, že reakční činidlo zředí zkoumaný vzorek. Mimo to je nutno mít k dispozici poměrně velké množství zkoumané látky pro standardní provedení titrace. Např. v případě, že má být titrací zjištěna hodnota pKa pro určitou sloučeninu a postup se sleduje UV spektrofotometrem, je zapotřebí mít k dispozici 1 mg zkoumané látky. V případě, že se tatáž analýza sleduje pH-metrem, je nutno mít k dispozici více než 3 mg zkoumané látky. Spektrofotometrické titrace obvykle nejsou prováděny automaticky, kdežto u potenciometrických titrací je to již obvyklé, avšak i při pokusech o automatizaci těchto diskontinuálních postupů nebylo možno postup příliš urychlit, bylo možno zpracovat pouze 1 až 5 vzorků za den a vždy bylo za potřebí, aby postup prováděl zkušený pracovník.

Jeden z automatických systémů pro titraci byl popsán v publikaci Yarnitzky, Instrumentation Science and Technology, svazek 23, č. 2, str. 91-102, 1995 při použití dvou peristaltických čerpadel, míchadla a dvou trojcestných ventilů. Systém vyžaduje, aby výkon obou čerpadel byl přesně stejný a využívá potenciometrické detekce nebo stanovení vodivosti a je nutno vypočítávat opravy na chyby čerpadla, míchadla a na prodlevu odpovědi detektoru. V publikaci Ando a Heimbach, J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 16, 1997, 31-37 se popisuje použití zařízení pro vysokotlakou kapalinovou chromatografii, HPLC, např. mísícího zařízení a čerpadla pro přívod vzorků, z nichž každý obsahuje pufr, nastavený na odlišné pH, do detektoru typu spektrofotometru.

Ve farmaceutickém průmyslu, stejně jako v jiných chemických odvětvích vzniká stálá snaha pro průzkum nových sloučenin, vhodných pro chemické účely i pro rekombinační genetické inženýrství, přičemž důraz je kladen na rychlost postupů. Ve farmaceutickém průmyslu je nutno rychle vyhodnotit vhodnost nových sloučenin jako potenciálních léčiv. Množství každé ze zkoumaných látek přitom může být velmi malé. V důsledku toho vzniká potřeba vyvinout citlivější postupy, které je mimo to s výhodou možno snadno automatizovat pro vyšší produktivitu práce a které mohou být s výhodou prováděny méně zkušenými laboratorními pracovníky.

Podstata vynálezu

Vynález se týká způsobu kontinuální titrace, při němž se nejméně jeden parametr nejméně jedné sloučeniny ve sledované směsi monitoruje, přičemž složení směsi se kontinuálně mění. Tato kontinuální změna může spočívat ve změně koncentrace jedné nebo většího počtu složek ve směsi, může např. jít o kontinuální, s výhodou lineární vzestup nebo pokles koncentrace některé látky nebo složky.

Při provádění způsobu podle vynálezu se spolu kontinuálně mísí nejméně dva proudy kapaliny, za vzniku výsledného proudu, který se

pak nechá projít detekční spektrofotometrickou zónou. Objemový poměr nejméně dvou proudů ve směsi, vstupující do detekční zóny je možno kontinuálně měnit v průběhu času změnou relativního poměru obou proudů, vytvářejících výsledný proud. Výsledný proud je s výhodou tvořen třemi nebo větším počtem dílčích proudů, které se kontinuálně mísí, přičemž objemový poměr dvou z těchto proudů se kontinuálně mění v průběhu času změnami jejich relativních podílů při tvorbě výsledné směsi.

Při obvyklém provádění potenciometrické titrace a titrace se stanovením vodivosti je obvykle limitujícím faktorem pro rychlost postupu reakční doba detektoru. Použití spektrofotometrické detekce je v tomto případě velmi výhodné, protože může podstatně urychlit provedení titrace.

Způsob podle vynálezu má tu další výhodu, že se roztoky nepřidávají po kapkách, nýbrž se kontinuálně mísí v měnících se poměrech, takže přesnost postupu již není omezena rozměrem přidávaných kapek. Mimo to může být postup tímto způsobem podstatně urychlen. Mísení je kontinuální, takže nevzniká prodleva při nutnosti dosažení rovnovážného stavu směsi po přidání každé kapky. Omezujícím faktorem může být rychlost průtoku, která je dosažitelná při použití určitého čerpadla, mísícího zařízení a potrubí. Další výhoda způsobu podle vynálezu spočívá v tom, že je možno rychleji zaznamenávat údaje na detektoru, na němž může být v případě moderního zařízení, např. spektrofotometrického detektoru s diodovým uspořádáním a pevnou geometrií optiky zaznamenávání velmi rychlé, např. 100 odečtů za sekundu, přestože při praktickém provádění postupu se obvykle hodnoty odečítají 10 až 30krát, např. 20krát za sekundu. Při tomto rychlém odečítání údajů nedochází k prudkým přechodům mezi jednotlivými zaznamenávanými údaji a je také možno snížit šum. Např. při odečítání 20 hodnot za sekundu je možno snadno vytvořit každé 2 sekundy průměrnou hodnotu, mimo to je tento způsob citlivější než běžné postupy detekce.

V některých provedeních se tedy způsob podle vynálezu týká kontinuální titrace, při níž se proud kapaliny, který obsahuje zkoumanou látku mísí s nejméně jedním dalším proudem kapaliny za vzniku výsledného sledovaného proudu, který se pak nechává projít, s výhodou stálou rychlostí detekční spektrofotometrickou zónou, načež se odečítají fyzikální nebo chemické parametry zkoumané látky. Výsledný proud je s výhodou směsí tří kapalných složek. Objem jedné z nich s výhodou zůstává stálý a obsahuje zkoumanou látku. Koncentrace této látky ve směsi tedy zůstává stálá. Procentuální objemové podíly druhé a třetí složky výsledného proudu se s výhodou mění v nepřímé závislosti, tzn., že při zvýšení objemu jednoho proudu se o stejnou hodnotu sníží objem druhého proudu, takže objem výsledného proudu zůstává stálý. Složky proudu, jejichž objem se mění, mohou obsahovat pufry, rozpouštědla, reakční činidla, organické a vodné fáze nebo jiné kapalné složky, jejichž koncentrace se vzájemně mění, čímž se mění také fyzikální nebo chemické prostředí pro zkoumanou látku. Popř. je možno do směsi přidávat ještě další kapalné složky ve stálém nebo měnícím se objemu. Je např. možno přidávat roztoky solí k udržení požadované iontové síly, indikátory, nebo je možno upravovat množství vody nebo jiného rozpouštědla k vyrovnání změn objemu jiných složek.

Ve zvláště výhodných provedeních jsou variabilními složkami dva linearizované pufry, což znamená, že při změně relativních podílů těchto dvou pufrů vzniká lineární gradient pH. Uvedené pufry budou s výhodou tvořeny např. kyselou a alkalickou složkou nebo solí téže sloučeniny, takže celkové chemické složení směsi zůstává v průběhu titrace konstantní a nejsou přiváděny žádné další ionty. Tato homogenita chemického prostředí je velmi výhodná pro chování látek, přiváděných do titračního systému, protože chování některých sloučenin se může změnit při podstatnější změně chemického prostředí a někdy může dokonce dojít i k vysrážení sloučeniny z roztoku ve formě pevné soli.

Např. v jednom provedení vynálezu, při němž má být stanovena hodnota pKa zkoumané látky se vytvoří výsledný proud ze tří složek. Jde o stálý objem roztoku s obsahem vzorku a o dva linearizované roztoky pufru, jejichž objem se vzájemně mění v obráceném poměru. Měří se absorbance při jedné nebo větším počtu vlnových délek, s výhodou jde o vlnové délky, při nichž se absorbance mezi ionizovanou a neionizovanou formou zkoumané látky od sebe liší. Tímto způsobem je změnami objemu jednotlivých pufrů možno získat lineární gradient pH. Hodnota pKa zkoumané látky je hodnota pH v polovině změny absorbance. V případě, že zkoumaná látka obsahuje více než jednu ionizovatelnou skupinu, bude možno pozorovat více než jednu změnu absorbance. V tomto případě bude možno pozorovat také více přechodných fází, které odpovídají hodnotám pKa druhé ionizovatelné skupiny.

Součást podstaty vynálezu tvoří také analytické zařízení, které je tvořeno nejméně dvěma vstupy pro proudy kapaliny, ústící do společného kanálu, detekční zónou, propojenou s tímto kanálem a výstupem, zařízení je dále opatřeno spektrofotometrickým detektorem pro monitorování proudu kapaliny, protékajícího detekční zónou a produkujícím údaje, které se týkají nejméně jedné chemické nebo fyzikální vlastnosti určité složky proudu kapaliny. Řídící prostředky mohou být propojeny se vstupem pro jednotlivé proudy pro řízení relativního množství kapaliny, přiváděného do společného kanálu každým ze vstupů pro jednotlivé proudy.

Jako detektor je možno použít jakýkoliv vhodný spektrofotometrický analytický detektor, pracující např. v ultrafialové nebo viditelné oblasti spektra, může však jít také o fluorimetr, polarimetr, kolorimetr nebo o jakékoli jiné zařízení, jímž je možno sledovat další změny, např. rozptyl světla, cirkulární dichroismus nebo optickou otáčivost.

Řídící prostředky pro řízení relativního množství kapaliny, přiváděného do společného kanálu každým vstupem pro kapalinu

mohou být tvořeny např. řídícím zařízením pro čerpadlo, tak jak je to běžné v případě HPLC. Je také možno propojit jeden nebo větší počet vstupů pro kapalinu s injekční stříkačkou, kterou je možno vstřikovat kapalinu vstupem do společného kanálu, přičemž písty stříkaček jsou ovládány mechanicky např. přes počítač. Každý odborník může navrhnout řadu dalších prostředků, jimiž je možno řídit přívod proudů kapaliny do společného kanálu tak, aby bylo možno řídit vzájemné podíly kapalin, vytvářejících výsledný proud a tím i rychlost průtoku výsledného proudu společným kanálem a detekční zónou. Při použití injekčních stříkaček nebo malých čerpadel, užívaných např. při HPLC v kombinaci s potrubím s malým průměrem a v kombinaci s mikroanalytickými detektory, např. spektrofotometry dovoluje použití velmi malých objemů zkoumané směsi. V důsledku toho je za potřebí použít také menšího množství zkoumané látky než v případě titrace běžného typu. Automatické injekční stříkačky mají také tu výhodu, že jejich takzvaný mrtvý objem je velmi malý a že jsou snadno programovatelné pro automatizaci celého postupu. Mrtvý objem v případě použití injekčních stříkaček se zmenšuje také tím, že odpadá mrtvý objem samostatného čerpadla.

V jednom z výhodných provedení je běžné čerpadlo pro HPLC spojeno se zásobníkem každé z kapalných složek směsi. Mísící čerpadlo přijímá kapalinu s obsahem zkoumané látky stálou rychlostí a mísí s ní první roztok pufru, přiváděný zvyšující se rychlostí a druhý roztok pufru, přiváděný snižující se rychlostí, takže výsledný objem a průtok výsledného proudu zůstává stálý, avšak relativní množství složek se v průběhu času mění. Měnící se podíly dvou linearizovaných roztoků pufrů mají za následek změnu pH směsi, ve výhodném provedení vzniká lineární změna pH v průběhu času. Takový systém je možno použít např. pro stanovení pKa zkoumané látky.

V dalším provedení může obsahovat zařízení pro automatický přívod vzorků zásobníky celé řady roztoků sloučenin, které mají být zkoumány, přičemž řada automatických stříkaček vždy tvoří zásobník

jedné ze složek kapaliny ve zkoumané směsi, např. zásobník pro první a druhý roztok pufru. Roztok prvního pufru se pak čerpá zvyšující se rychlostí z první automatické stříkačky do mísicí komory a roztok druhého pufru se čerpá do mísicí komory se snižující se rychlostí, takže celkový objem a průtok výsledné směsi zůstává konstantní, avšak relativní množství každé ze složek se mění v průběhu času. Měnící se podíly dvou linearizovaných roztoků pufrů ve směsi mají za následek změnu pH směsi, přívody jednotlivých pufrů se s výhodou řídí tak, aby tato změna pH byla v průběhu času lineární. Zařízení pro automatické odebírání vzorků odebere vzorek kapaliny s obsahem zkoumané látky a vstříkne tento vzorek stálou rychlostí do směsi pufrů za vzniku výsledného proudu, který projde detektorem. Tento systém je možno použít např. ke stanovení pKa zkoumané látky.

Povaha a počet kapalin, jejichž smísením vzniká výsledný proud bude záviset na prováděné analýze. Např. v případě, stanovení dělicího koeficientu molekuly může být proud kapaliny s obsahem zkoumané látky, přiváděný do zařízení udržován na stálé hodnotě a současně se bude měnit průtok obou fází, mezi něž má být molekula zkoumané látky rozdělena, a to s výhodou lineárně. Příkladem fází pro dělení molekul mohou být emulze typu olej ve vodě nebo emulze jiných organických rozpouštědel ve vodném rozpouštědle, např. emulze oktanolu ve vodě, micelly smáčedla, např. dodecylsíranu sodného SDS a také fosfolipidu, např. liposomy DMPC, každý odborník může snadno vybrat příslušnou směs pro určitou zkoumanou látku podle svých běžných znalostí. V jiném provedení je možno vytvořit v proudu kapaliny s obsahem zkoumané látky lineární gradient pH, jak již bylo uvedeno svrchu a uvést jej do styku s proudem organické fáze, např. oktanolu, např. v zařízení, které bylo vyvinuto v CRL (Central Research Laboratories Ltd., spojeno s EMI group plc) nebo v BNFL (British Nuclear Fuels Limited). Tato zařízení jsou upravena tak, aby umožnila průtok vodných a organických fází ve vzájemném styku a pak jejich úplné oddělení. Podrobnosti je možno

nalézt v publikaci Eureka, Transfers Technology, říjen 1997, strana 42. Z rozdílu v hodnotách pKa pro zkoumanou látku v přítomnosti a v nepřítomnosti organické fáze je pak možno vypočítat dělicí koeficient pro tuto látku.

V případě, že parametrem, který má být stanoven, je koeficient pro vazbu zkoumané látky s druhou molekulou nebo s jiným reakčním činidlem, pak mohou kapaliny, jejichž vzájemný podíl se mění obsahovat jednu nebo obě reakční složky, které se mají na sebe vázat a/nebo roztoky solí nebo pufrů pro řízení iontové síly a/nebo pro řízení pH směsi. Je např. možno postupovat tak, že se roztok zkoumané látky přivádí svrchu uvedeným způsobem jako stálá složka výsledné směsi. Místo změny pH v průběhu času např. mísením dvou pufrů se pak titruje ligand proti vodě nebo proti rozpouštědlu v přítomnosti rozpuštěné zkoumané látky, takže vzniká kontinuální, s výhodou lineární gradient koncentrace ligandu. Jako příklad takového systému je možno uvést dvojvazný nikl a ethylendiamin. Interakcemi, které by mohly být sledovány při použití způsobu a zařízení podle vynálezu by mohly být také např. interakce mezi enzymy a jejich substráty nebo kofaktory, interakce mezi chelatačními činidly a kovovými ionty, mezi receptory a jejich agonisty nebo antagonisty, mezi protilátkami a jejich antigeny, nebo je možno sledovat intenzitu interakce v jakékoliv formě komplexu nebo specifického vazného páru látek. Získané údaje je pak možno analyzovat běžným způsobem.

V případě, že se sleduje rozpustnost určité látky v různých rozpouštědlech, sleduje se vliv dvou nebo většího počtu různých rozpouštědel na zkoumanou látku. Další příklady použití budou odborníkům zřejmé.

V některých provedeních je možno automatické stříkačky nebo zásobníky a mísící čerpadla nahradit jinými systémy pro čerpání, kterými je možno převádět z místa na místo velmi malé objemy kapaliny s vysokou přesností. Vhodným systémem pro toto použití jsou peristaltická čerpadla, která však v některých případech mohou

způsobit pulsování čerpané směsi a také čerpadla s digitálními ventily a potrubím s velmi malým průměrem. Je samozřejmé, že zařízení může být opatřeno dvěma nebo větším počtem různých typů čerpadel. V případě, že se neužívá mísícího čerpadla, je žádoucí mísit složky výsledného proudu jakýmkoliv jiným způsobem, např. při použití jakéhokoliv běžného míchadla.

Jak již bylo svrchu uvedeno, v případě, že molekula má jedinou ionizovatelnou skupinu a ionizovaná a neionizovaná forma této látky absorbuje v ultrafialovém světle odlišným způsobem, bude možno zaznamenat změnu absorbce v případě, že dojde ve směsi ke změně ve prospěch ionizované nebo neionizované formy zkoumané látky. Ve formě diagramu je tato situace znázorněna na obr. 11, 14 a 15. V případě jediné ionizovatelné skupiny se měří pH, které odpovídá polovině změny absorbance. Tato hodnota je současně hodnotou pKa pro tuto látku, tzn. hodnotou pH, při níž je ionizováno 50 % molekul této látky. Rozhodující bod na křivce je možno stanovit běžnými postupy. Zejména je možno použít první derivaci odečtu absorbance proti pH, čímž se získá hodnota vrcholu, který odpovídá přechodu mezi jednotlivými částmi křivky. V některých případech je možno nalézt bod, v němž křivka přechází z jedné fáze do druhé snadno pouze v tom případě, že je možno pozorovat nejnižší a nejvyšší hodnotu absorbance, což vyžaduje delší období gradientu pH, jak je zřejmé z obr. 11.

Při ionizaci v jediném stupni je pH a bod, v němž se křivka mění ekvivalentní hodnotě pKa. Podle publikace Irving a další, Analyst 80, 83-94, 1955 je možno použít první derivace ke stanovení hodnoty pKa v postupech, které zahrnují dva ionizační stupně. Rozšíření tohoto postupu na více než dva ionizační stupně je však pro výpočet příslušných hodnot velmi složité.

Alternativním postupem pro analýzu získaných hodnot je cílená analýza těchto faktorů, TFA. Metodu TFA je možno použít k odvození hodnot pKa z absorpčního spektra, které je zaznamenáváno na větším

počtu vlnových délek v různých časech při různém pH v průběhu titrace. Matrice N_s pro absorbanci se násobí vlnovou délkou N_w a získaná hodnota se rozloží na lineární kombinaci hlavních složek při použití příslušné analýzy složek PCA, metoda byla popsána v publikacích D. Perez-Bendito, Analyst, svazek 115, 689-698, 1990 a E. R. Malinowski, Factor Analysis in Chemistry, 2. vydání, 1991, pub. Wiley, New York. Složky se pak identifikují pomocí TFA v předpokládaném reakčním modelu. Jako praktický příklad použití TFA při stanovení pKa pro léčiva je možno uvést postup, který byl popsán v Allen R. I. a další, J. Pharm. and Biomed. Analysis, 1998, svazek 17, 699-712, srovnání s analýzou první derivace uvedených hodnot, tak jak byla svrchu popsána bylo provedeno v publikaci Tam, K. I. and Tacacs-Novak, K., Pharm. Research, submitted.

Způsob kontinuální titrace dovoluje vytvoření rychlého lineárního gradientu pH v rozsahu širokého rozmezí pH při použití příslušných pufrů, jak bude dále popsáno. Tím je umožněno rychlé stanovení hodnot pKa. Zařízení je obvykle opatřeno pH-metrem kromě spektrofotometrického detektoru, takže absorbance může být stanovena v průběhu času nebo ve vztahu k okamžitému pH. Avšak v případě, že rychlost gradientu pH je vysoká, nemusí elektroda pro stanovení pH reagovat dostatečně rychle, takže dochází k chybným výsledkům. V této situaci je možno gradient kalibrovat při použití sloučenin se známými hodnotami pKa. Při lineární regresi známé hodnoty pKa standardních sloučenin proti času dosažení maxima při první derivaci křivky pro absorbanci pro známou látku při kontinuální titraci je možno připravit kalibrační křivku, kterou je pak možno použít ke stanovení pKa neznámých látek bez měření pH. Stanoví se doba do dosažení maxima pro zkoumanou látku při použití téhož gradientu a hodnota pKa se jednoduše odečte z kalibrační křivky. Čas do dosažení maxima je možno měřit od začátku gradientu, musí pouze jít o stálý začátek, užívaný pro všechny standardní i zkoumané látky. Přestože se pak užívá kalibrace gradientu místo přímého měření pH, je možno

zachovat elektrodu pro stanovení pH v zařízení např. pro ověřování chodu zařízení nebo pro stanovení, zda zůstává gradient pH stále lineární.

Způsob podle vynálezu je zvláště výhodný pro stanovení málo rozpustných sloučenin, vzhledem k tomu, že při použití tohoto způsobu je zapotřebí mít k dispozici jen velmi malé koncentrace a velmi malé objemy roztoku, např. 100 až 10 mikrogramů/ml při množství stovek mikrolitrů, kdežto při běžném stanovení je zapotřebí přibližně 100 ml roztoku. Další výhodou je použití vysoce citlivých detektorů spolu s automatickým shromažďováním údajů. Za těchto podmínek je také možno použít daleko méně koncentrované vzorky. Mimo to není vůbec zapotřebí znát koncentraci zkoumané látky, protože výstup ze zařízení může být převeden na grafický záznam, tzn., že se vyjadřují např. změny absorbance a nikoliv absolutní hodnoty, takže tvar křivky znázorní změny ionizačního stavu, změny fáze nebo jiné změny zkoumané látky. V tomto případě je dostatečné, aby koncentrace chromoforu byla rozlišitelná spektrofotometrem.

V poslední době je často zapotřebí stanovit i látky, získané pomocí kombinačních chemických bank, takže stoupá počet látek, které je nutno analyzovat a současně jsou tyto látky k dispozici ve velmi malém množství. Jak již bylo svrchu uvedeno, je pomocí způsobu a zařízení podle vynálezu možno tyto problémy překonat. Problémy mohou vznikat také pokud jde o čistotu vzorku v případě, že látka je vyrobena jako část banky, i v tomto případě je možno automatizací kontinuální titrace tyto problémy vyřešit. Je například možno upravovat chromatografické dělení pomocí HPLC a kontinuální titraci tak, aby tyto postupy na sebe navazovaly, takže vzorky, čištěné pomocí PHLC se přímo odebírají zařízením pro automatický odběr vzorků, které tyto vzorky přímo vstřikuje do proudu při kontinuální titraci, jak bude dále podrobněji popsáno. Není přitom zapotřebí žádného zásahu odborného pracovníka, celý postup je zcela

automatizován. Tímto způsobem je možno přímo prokazovat při titraci vrcholy pro čištěné látky z příslušné banky.

Vynález bude podrobněji popsán v souvislosti s přiloženými výkresy.

Přehled obrázků na výkresech

Na obr. 1 je schematicky znázorněno první provedení zařízení podle vynálezu.

Na obr. 2 je schematicky znázorněno zařízení podle vynálezu podle jeho druhého provedení.

Na obr. 3 je schematicky znázorněno sestavení jednotlivých částí zařízení z obr. 2.

Na obr. 4 je schematicky znázorněno elektrické propojení jednotlivých částí zařízení z obr. 2.

Na obr. 5 je schematicky znázorněno elektrické řízení přístroje z obr. 2.

Na obr. 6 je podrobně schematicky znázorněno propojení v koncovém bloku zařízení z obr. 2.

Na obr. 7 je schematicky znázorněno třetí provedení zařízení podle vynálezu.

Na obr. 8 je schematicky znázorněno zařízení podle vynálezu podle 4. provedení.

Na obr. 9 je schematicky znázorněno připojení detektoru v zařízení z obr. 8.

Na obr. 10 je znázorněno schema automatického provádění odběru vzorků zařízením z obr. 8.

Na obr. 11 je schematicky znázorněn vztah mezi pKa, absorbancí a první derivací absorbance pro sloučeninu, která má jedinou ionizovatelnou skupinu a v níž má ionizovaná neionizovaná forma odlišnou absorbanci.

Na obr. 12 je znázorněna kalibrační křivka, odvozená při titraci srovnáním se sloučeninou se známým pKa.

Na obr. 13 je znázorněno pH v závislosti na čase při vytváření lineárního gradientu.

Na obr. 14 je znázorněna křivka absorbance pro 4-CN-fenol při použití gradientu z obr. 13.

Na obr. 15 je znázorněna křivka pro první derivaci absorbance z obr. 14.

Na obr. 16 je znázorněna křivka absorbance pro koncový bod titrace podle příkladu 4.

Na obr. 17 je znázorněna kalibrační křivka pro koncový bod titrace z příkladu 4.

Na obr. 18 je znázorněna křivka pro vztah mezi pH a procentuální koncentrací kyseliny pro lineární gradient, při němž byla provedena křivka z obr. 12.

Na obr. 19 je znázorněna kalibrační křivka pro koncový bod titrace z příkladu 5.

Na obr. 20 je znázorněna kalibrační křivka pro komplexometrickou titraci podle příkladu 6.

Na obr. 21 až 24 jsou znázorněny různé křivky, získané v průběhu zpracování naměřených údajů.

Na obr. 25 je znázorněna křivka pro průběh pKa, získaná při použití zařízení podle obr. 8 při srovnání s literárními hodnotami pro pKa pro 10 sloučenin.

Na obr. 26 je znázorněna obdobná křivka jako na obr. 25 pro jiných 10 sloučenin.

Na obr. 27 je znázorněna další obdobná křivka pro celkem 35 různých látek.

Praktické provedení vynálezu bude osvětleno následujícími příklady, které však nemají sloužit k omezení rozsahu vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

A. Zařízení z obr. 1 a 2

V prvním provedení bylo zařízení sestaveno s částí, které se obvykle v laboratořích nacházejí a bylo tvořeno následujícími jednotkami:

automatické zařízení pro odběr vzorků Gilson Aspec XL,
qarterní HPLC čerpadlo Hewlett Packard 1050,
spektrofotometrický detektor s diodovým uspořádáním DAD Kontron 440,
počítač 66 MHz 486 PC s kartou Strawberry Tree Data,
terminální panel Dynares 8 Ultra (+71-TC),
software Dasylab pro uložení údajů,
PEEK potrubí (vnější průměr 1,6 mm).

Schematické znázornění celého uspořádání je uvedeno na obr. 1 a 2, přičemž na obr. 4 je znázorněna sestava jednotlivých částí a na obr. 5 jejich elektrické propojení.

Zlepšení systémů pufrů

V původním vyvinutém systému byly použity 4 roztoky, které byly smíseny na lineární gradient, jak je znázorněno na obr. 1. Vzorek s konstantní objemovou koncentrací byl titrován pomocí kyseliny jako na obr. 1 nebo pomocí baze a objemová procenta roztoku soli byla snižována při zvyšování objemu roztoku kyseliny nebo baze tak, aby iontová síla byla udržována v přijatelném rozmezí. V systému byl použit pufr v konstantním objemu. Při dalším zlepšování systému bylo možno systém omezit na tři složky, a to na roztok vzorku, jehož množství se v průběhu času nemění a na dva linearizované roztoky pufru, z nichž jeden má kyselou a druhý alkalickou reakci, přičemž objemy těchto roztoků se v průběhu času mění nepřímo úměrně k sobě navzájem, jak je znázorněno na obr. 2.

Funkce zařízení z obr. 2.

V průběhu tvorby gradientu se vzorek, který obsahuje zkoumanou látku odebírá stálou rychlostí ze zařízení pro automatický odběr vzorků do kanálu A čerpadla HP 1050. Současně se do čerpadla přiváději různá množství dalších složek. Univerzální pufr B (bazická složka, jak bude dále vysvětleno) se přivádí ze zásobníku do kanálu B. Podobným způsobem se univerzální pufr A (kyselá složka) přivádí do kanálu C. Jeden z pufrů zvětšuje svůj objem od 0 nebo velmi malého množství až do 80 % směsi nebo do ještě vyššího množství na konci stanovení. Druhý pufr naopak zmenšuje svůj objem z původního množství 80 % směsi nebo ještě vyššího množství až do 0 nebo velmi nízké koncentrace na konci stanovení.

V případě gradientu zvyšujícího se pH bude podíl pufru B v průběhu času stoupat, kdežto podíl pufru A bude klesat. Zbytek směsi tvoří roztok zkoumané látky v kanálu A, popř. s dalšími složkami podle potřeby, např. s vodou, smáčedlem nebo dalšími reakčními složkami, které mohou být přiváděny do kanálu D čerpadla HPLC.

Směs složek je pak přiváděna z výstupu uvedeného čerpadla do spektrofotometru Kontron 440 DAD a pak do odpadu, popř. přes pH-metr, který může být použit pro sledování správné funkce systému, např. pro ověření linearity vytvořeného gradientu pH.

Jak již bylo svrchu uvedeno, může být použitým potrubím např. potrubí z nerezové oceli s průměrem 1,6 mm, PEEK.

V případě, že má být změřena řada vzorků, je možno zařízení nastavit tak, aby v něm opakovaně probíhal cyklus se 4 odlišnými fázemi: 1) Pufry a další složky se čerpají HPLC čerpadlem stálou rychlostí ve fixovaném poměru k dosažení stabilního výchozího bodu pro tvorbu gradientu. 2) Vytvoří se gradient změnami poměru složek pufru. 3) Konečné podmínky gradientu se udržují po krátké časové období a pak se 4) systém opět připraví pro další cyklus, např. propláchnutím vodou nebo jiným rozpouštědlem na konci cyklu, takže je možno analyzovat další vzorek.

Elektrické propojení zařízení z obr. 2.

Jak je zřejmé z obr. 4, jsou údaje ze spektrofotometru a z pH-metru přiváděny do terminálního bloku a tím do počítače, kde jsou zachyceny pomocí softwaru Dasylab. Je však možno použít i jiný systém pro zachycení a zpracování údajů. Znázorněné provedení je omezeno na 4 analogové výstupy ze spektrofotometru, takže 4 kanály pro přenos dat ze spektrofotometru jsou spojeny s výstupy 1 až 4 terminálního bloku a analogový signál z pH-metru je spojen se vstupem 5. Kabely jsou stíněny a tím chráněny před šumem, který může vznikat při vysoké frekvenci. Propojení v terminálním bloku je podrobněji znázorněno na obr. 6.

Jak je zřejmé z obr. 4, je zařízení pro automatický odběr vzorků spojeno s čerpadlem, spektrofotometrem a terminálním blokem. Jde o digitální signály, které určují začátek a konec pokusného cyklu. Signály, které směřují k čerpadlu, spektrofotometru a terminálnímu bloku jsou podrobněji znázorněny na obr. 5.

B. Další provedení

Na obr. 7 je znázorněno podobné zařízení jako na obr. 2, avšak složky pufru jsou přiváděny do mísícího zařízení z automatizovaných stříkaček a nikoliv čerpadlem ze zásobníku. V tomto systému je možno pomocí stříkačky přidávat i další složky, např. smáčedla apod. Stříkačkou je možno přivádět i vzorek, přestože při analýze většího počtu vzorků je výhodnější použít automatického zařízení pro odběr vzorků, protože toto zařízení nevyžaduje přítomnost pracovníka.

Na obr. 8 a 9 jsou znázorněna další provedení zařízení, v nichž se užívá automatických stříkaček pro přívod složek pro vytvoření gradientu. Toto zařízení sestává z následujících částí:
System pro tvorbu gradientu (Sirius Analytical Instruments Ltd.)
T-kus pro mísení (Thames Restek)
kompaktní průtoková mikrobuňka (Hellma-ref. 178.713)
potrubí FEP zevní průměr 1,6 mm, vnitřní průměr 0,8 mm

vstřikovací místo MSP9000/XL3000 (Cavro)
přívod proudu (Cathodeon - C720)
deuteriová lampa, 210 nm - 700 nm (Cathodeon-J27)
držák pro mikrobuňku (Hellma-664.000)
kabely UV/VIS s čočkami (Hellma-041.002 UV/VIS)
spektrofotometr MMS s diodovým uspořádáním 256 (Zeiss-224.000-9001.000)
12-bitový elektronický adaptor MMS (Zeiss-792200-9009.000)
displey počítače, 12-bitů CIO-DAS 16jr (Talisman)

Jak je zřejmé z obr. 8, mísí se oba proudy ze stříkaček v T-kusu, který má celkový objem 4 mikrolitry. Proud pak přechází do smyčky k lepšímu promísení a pak do vstřikovacího otvoru zařízení pro automatický odběr vzorků. V tomto místě může zařízení pro automatický odběr vzorků přidávat vzorky do proudu kapaliny. Od tohoto místa je výsledný proud veden do průtokové komory spektrofotometru a pak do odpadu.

Na obr. 9 je znázorněno elektrické propojení zařízení z obr. 8 a spojení pomocí optických vláken. Deuteriová lampa je řízena transistorovým signálem TTL, který řídí také okruh pro přívod energie. Deuteriová lampa má být před počátkem pokusu předehřáta. Toto předehřívání trvá obvykle 1/2 h. Signál TTL je řízen počítačem, takže lampa je pak automaticky vypínána a zapínána. Od lampy vede optické vlákno k držáku pro mikrokomůrku, takže tento držák je udržován ve své poloze tak, aby se průtoková komůrka nacházela vždy v dráze světelného paprsku. Polohu přijímajícího vlákna je možno upravovat přímo v oblasti držáku a vlákno je možno fixovat v jeho poloze při použití šroubku. Toto vlákno je pak spojenu se spektrofotometrem MMS. Toto uspořádání umožní převod údajů ze spektrofotometru přímo na displey počítače.

Řízení

Hlavní řídicí program byl vytvořen jako program LabView Virtual Instrument. Je určen k řízení těchto hlavních periferních částí:
lampa spektrofotometru ve smyslu vypnutí a zapnutí,
modul pro tvorbu gradientu ve smyslu spouštění,
zařízení pro odběr vzorků,
spektrofotometr, vyvolání pulzů a spouštění.

Hlavní řídicí program na začátku pokusu přivádí všechny části zařízení do pohotovosti, aby bylo možno zahájit analýzu. Uživatel zařízení si může zvolit, zda chce uchovat veškeré údaje od začátku do konce pokusu. Uživatel také může rozhodnout, zda jednotlivé pokusy mají být řízeny od začátku až do konce nebo pouze programovány tak, aby je zařízení provádělo kontinuálně, samostatně až do ukončení.

Systém Sirius pro tvorbu gradientu zahrnuje řídicí panel s mikroprocesorem 80C552, dva vstřikovací členy typu stříkačky Sirius, displey Datavision a klávesnici. Displey a klávesnice tvoří jednoduchou pomůcku, jíž je možno řídit variabilní prvky gradientu v proudu kapaliny. Gradientový modul obsahuje program, který dovoluje uživateli nastavovat parametry pokusů při tvorbě gradientu. Těmito parametry jsou:
- celková rychlost průtoku v ml/min,
- doba do nastavení gradientu v sekundách, např. v případě, že gradient stoupá, je zapotřebí jej nastavit zpět na nízkou hodnotu před vstříknutím dalšího vzorku,
- celková doba gradientu v sekundách,
- doba mezi jednotlivými gradienty v sekundách, tzn. doba do úplného vyprázdnění průtokové komůrky spektrofotometru.

Tyto parametry je možno také nastavit přes seriový port z řídicího počítače. Tímto způsobem je možno řídit obě stříkačky současně. Jakmile je gradientový modul nastaven do přípravné polohy READY, je možno zahájit pokus spouštěcím signálem, který je automaticky vydáván z hlavního řídicího počítače. Jakmile je tento

signál zjištěn modulem pro tvorbu gradientu, začíná probíhat pokus, na jehož konci se zařízení automaticky nastaví do polohy, připravené na zahájení dalšího pokusu, v níž zařízení čeká na další signál pro spuštění dalšího pokusu.

Jakmile po vstřiknutí vzorku začíná pokus, zařízení pro automatický odběr vzorků vstřikne vzorek do smyčky. Na obr. 10 je znázorněn systém řízení zařízení pro automatický odběr vzorků. Rameno se pohybuje do místa vstřiknutí. Spouštěcí signál je vyslán do modulu pro tvorbu gradientu pro zahájení průtoku a také do deuteriové lampy. V předem definovaném časovém úseku se počítají odebírat hodnoty v intervalech 0,5 s. Vzorek se vstřikne do proudu kapaliny. Zařízení odebere 6 hodnot ze spektrofotometru, vypočítá průměr z posledních 5 hodnot a tento průměr uloží. Tento postup probíhá aktivací kódu CIN, propojeného s řídícím panelem, který shromažďuje výsledky absorbance při 256 vlnových délkách a získané hodnoty ukládá na disk ve specifickém souboru.

Ukládání a zpracování dat

Ukládání dat bylo zjednodušeno vytvořením příslušného systému pro ukládání a zpracování dat na základě signálu z diodového uspořádání. Hardware je propojen s elektronikou Zeiss. Při ukládání dat se vysílá spouštěcí signál, oznamující, že je zapotřebí uložit výsledek měření. Elektronika Zeiss řídí diodové uspořádání i ukládání dat. Také upravuje napětí z 0V do +2,5V, přičemž využívá analogového a digitálního konvertoru ADC.

Ke zvýšení signálu v poměru k šumu je využito odebírání hodnoty ve tmě při vypnuté lampě a získaný výsledek se odečte od všech ostatních výsledků, které byly odečteny po zapnutí lampy. Každý výsledek se zaznamená 6krát, první výsledek se odloží a ze zbývajících 5 výsledků se vytvoří průměr, jak již bylo uvedeno svrchu. Tato hodnota se uloží v počítači. Tento postup trvá přibližně 300 ms. Jednotlivé výsledky se odečítají v intervalech 500 ms. Výsledný soubor

dat obsahuje výsledek pro každý vzorek, odečtený při 256 vlnových délkách.

Soubory dat obsahují 480 údajů pro vlnovou délku a jsou převáděny na formát, vhodný pro zpracování dat, a to buď vytvořením první derivace nebo analýzou TFA, jak bylo popsáno svrchu. Údaje z diodového uspořádání je nutno převést na údaje o absorbanci při použití rovnice:

A = log10 (I(ref) - I(dark))/(I(sample) - I(dark))

kde:

I(sample) je intenzita energie v gradientu se vzorkem pro určitý kanál nebo vlnovou délku,

I(dark) je proud za temna a

I(ref) je počáteční referenční hodnota pro pufr B se vzorkem.

Program tohoto typu dovoluje uživateli zjistit, které vlnové délky mají být zvoleny pro algoritmus zpracování dat a z výsledných dat vytváří soubor. Avšak v případě, že má být využit program analýzy TFA, je nutno nejprve vytvořit první derivaci pro výpočet gradientu pH. Tento gradient pH se vypočítá z údajů pro sloučeniny, které mají dobře definovanou hodnotu pKa a jsou proto označovány jako standardní látky. Tímto způsobem se získá stupnice pH, nezbytná pro vytvoření algoritmu pro analýzu TFA.

Dříve než je možno analyzovat v systému jakýkoliv vzorek, je nutno provést zkoušku se slepým vzorkem, který obsahuje pouze vodu nebo příslušné rozpouštědlo, mimo to je nutno použít kalibrační standardy. Pomocí slepé zkoušky se získá informace o gradientu vzhledem k vodě. Získané hodnoty je pak nutno odečíst od všech výsledků, které byly získány pro standardní sloučeniny i pro vzorky. Aby bylo možno ze získaných údajů vytvořit informace pro absorbční vrcholy, je nutno využít vyvážení dat a pak první derivaci v lineární úseku křivky. Uživatel je schopen definovat počet bodů, jichž se vyvážení týká, přičemž musí jít o lichý počet bodů. Algoritmus pro zpracování dat se pak aplikuje na každý bod v souboru. Po ukončení

této analýzy je nutno nalézt vrcholy. To je možno uskutečnit rozdělením získaných hodnot do jednotlivých úseků se specifickou velikostí a v každém úseku se pak hledají vrcholy, které odpovídají kritériím pro minimální a maximální vrcholy.

Příklad 2

A. Stanovení pKa - zařízení z obr. 2

Na obr. 2 je schématicky znázorněno zařízení pro vytvoření lineárního gradientu pH při použití pufrů. Na tomto zařízení byl proveden následující pokus ke stanovení hodnoty pKa.

Lineární gradient pH byl vytvořen smísením roztoku vzorku, jehož množství se v průběhu tvorby gradientu nemění a dvou roztoků pufrů, z nichž jeden je kyselý a druhý alkalický, přičemž množství obou roztoků se lineárně mění v průběhu času v obráceném poměru. Oba pufry mají společnou složku, k níž se přidává kyselá složka k vytvoření pufru A a alkalická složka k vytvoření pufru B. Pufry jsou vytvořeny následujícím způsobem:

Roztok C: společná složka (1 litr)

do 1 litru vody se přidá:		
kyselina boritá (FLUKA 15660)	24,732 g (Mw 61,83)	= 0,4 M
TRIS (FLUKA 93350) (hydroxymethylaminomethan)	48,456 g (Mw 121,4)	= 0,4 M
butylamin (FLUKA 19480)	29,256 g (Mw 73,14) 39,696 ml, hustota 0,737	= 0,4 M

Mw = molekulová hmotnost

Pufr A - 1 litr

do 500 ml roztoku C se přidá:	
KH_2PO_4 (BDH ANALAR 10203)	27,218 g (Mw 136,09)
monohydrát kyseliny citronové	42,028 g (Mw 210,14)
HCl	350 ml (1 M roztok)

roztok se doplní vodou na objem 1000 ml, čímž se získá:

KH_2PO_4	0,2 M
monohydrát kyseliny citronové	0,2 M
HCl	0,35 M
pH je přibližně	2,8

Pufr B - 1 litr

do 500 ml roztoku C se přidá:

K_2HPO_4 (FLUKA 60356)	34,836 g (Mw 174,18)
K_3citrát (monohydrát) (FLUKA 60153)	64,884 g (Mw 324,42)
KOH (ALDRICH 31,936-8)	400 ml (0,5 M)

roztok se doplní na objem 1000 ml vodou, čímž se získá

K_2HPO_4	0,2 M
K_3citrát	0,2 M
KOH	0,2 M
pH je přibližně	11,58

Složka A (kyselá) a složka B (alkalická) musí být zředěny před použitím v poměru 1:10 a pak se užijí k vytvoření gradientu HPLC. Hodnota pH pro takto zředěné pufry je následující:

kyselá složka, pufr A = 3,01

alkalická složka, pufr B = 11,19

Linearita tohoto systému pufrů byla postupně podrobena zkouškám při použití HPLC čerpadla HP1050 pro mísení pufrů při rychlosti průtoku 5 ml/min, přičemž pH bylo zaznamenáváno pomocí průtokové elektrody pro stanovení pH (Pharmacia). Relativní množství pufru A a pufru B bylo udržováno na stálé hodnoty až do stabilního odečtení hodnoty pH a pak bylo relativní množství změněno na následující stupeň, na němž bylo opět udržováno až do odečtení příslušné hodnoty. Opakováním tohoto postupu bylo možno vytvořit celý gradient.

Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce a graficky jsou znázorněny na obr. 18.

% pufru A	% pufru B	pH
100	0	2,91
90	10	3,9
80	20	4,71
70	30	5,45
60	40	6,2
50	50	6,98
40	60	7,77
30	70	8,57
20	80	9,46
10	90	10,39
0	100	11

Z obr. 18 je zřejmé, že gradient pH je vpodstatě lineární od pH 3 až do pH 11.

Sloučeniny se známou hodnotou pKa byly vstřikovány do zařízení z obr. 2, přičemž gradient byl v tomto případě kontinuální, množství pufru A se pohybovalo od 80 do 0 % a množství pufru B od 0 do 80 % v průběhu 4 minut. Roztok vzorku byl udržován na konstantní hodnotě 20 % objemu směsi. V tomto případě bylo opět použito čerpadlo PH1050 pro vstřikování pufru B do kanálu B a pro vstřikování pufru A kanálem C. Průtok výsledného proudu z mísícího zařízení k detektoru byl 1 ml/min.

Byly zaznamenávány změny absorbance při vlnových délkách 240, 265, 290 a 315 nm a byly stanoveny maximální vrcholy při použití první derivace. Z vrcholů byla vytvořena kalibrační křivka, znázorněná na obr. 12 při použití známých hodnot pKa pro standardní sloučeniny, které byly stanoveny běžnou titrací. Sloučeniny se známou hodnotou pKa pak byly rovněž stanoveny uvedeným způsobem.

Výsledky kalibrace jsou uvedeny v následující tabulce. Čas, naměřený do dosažení maxima byl měřen od počátku pokusu, tzn. od okamžiku, kdy zařízení pro automatický odběr vzorků poprvé odebere vzorek ze zásobníku pro zkoumanou látku.

Standardy

	Známá pKa*	Doba do maxima		
Kys. benzoová	3,96	217,3		
fenol	9,766	444,8		
ftalát 1**	4,82	251,8		
4-NO_2fenol	6,89	334,7	Intercept	-1,5717
kys. benzoová	3,96	216,3	Sklon	0,0254
fenol	9,766	445		
ftalát 1	4,82	249,8	R2=	0,9998
4-NO_2fenol	6,89	334,9		
kys. benzoová	3,96	216,5		
fenol	9,766	444,3		
ftalát 1	4,82	251,5		
4-NO_2fenol	6,89	334,7		

** alkaličtější z obou hodnot pKa pro hydrogenftalát draselný

* stanoveno potenciometrickou titrací na zařízení Sirius PCA 101 v 0,15 M KCl.

Výsledky pro zkoumané látky a zbytky látek jsou uvedeny v následující tabulce.

Vzorek	Známá pKa*	Doba do maxima	Odvozená pKa	Zbytek
3-Cl fenol	8,81	407,5	8,79	0,02
4-Cl fenol	9,14	4021,2	9,14	0,00
2-Cl fenol	8,24	382,8	8,16	0,08
4-CN fenol	7,7	360	7,58	0,12
3-Cl fenol	8,81	406,8	8,78	0,03
4-Cl fenol	9,14	420,8	9,13	0,01
2-Cl fenol	8,24	382,3	8,15	0,09
4-CN fenol	7,7	361,3	7,62	0,08
3-Cl fenol	8,81	407,3	8,79	0,02
4-Cl fenol	9,14	421	9,14	0,00
2-Cl fenol	8,24	382,3	8,15	0,09
4-CN fenol	7,7	360	7,58	0,12

*stanoveno potenciometrickou titrací na zařízení Sirius PCA 101 v 0,15 M KCl.

Odvozené hodnoty pKa, stanovené při použití kalibrační křivky jsou velmi blízké očekávaným hodnotám.

Na obr. 13, 14 a 15 jsou uvedeny další kalibrační křivky. Na obr. 14 je uvedena křivka absorbance při 290 nm, na obr. 15 její první derivace pro 4-CN fenol při použití svrchu uvedeného gradientu. V případě, že hodnota pKa, odpovídající době do vytvoření maxima, tzn. 361 sekund je odečtena z kalibrační křivky pro uvedený gradient pH, je odvozená hodnota pKa 7,64. Očekávaný výsledek je přitom 7,7 při výpočtu z tradiční titrace s použitím přístroje Sirius PCA 101.

Postup je možno dále zlepšit tak, že se kalibrační křivka uloží přímo do programu pro zpracování dat, např. do počítače, který ukládá odečtené hodnoty absorbance, vytvořené v detektoru. Počítač pak může sám vytvořit první derivaci z těchto odečtených hodnot, stanovit dobu do odečtení vrcholu a např. použít tabulky, odvozené od kalibrační křivky absorbance a tak zjistit odpovídající hodnotu pKa pro

zkoumaný vzorek. Tato hodnota se pak přímo objeví jako výsledek bez nutnosti jakéhokoli výpočtu ze strany pracovníka.

B. Stanovení pKa - zařízení z obr. 8

Gradient:

Složení pufru bylo dále optimalizováno ke zlepšení linearity gradientu při udržení fyziologické iontové síly bez podstatného snížení kapacity pufru. Složky byly voleny tak, aby měly co nejmenší absorpci ve viditelném světle i v UV-záření. Složení pufru je dále uvedeno a srovnáno se složením, uvedeným svrchu v příkladu 2A.

Složka A (kyselý pufr):

	Příklad 2A složení	Optimální složení
TRIS (M)	0,020	0,01237
Kyselina boritá (M)	0,020	0,01397
Butylamin (M)	0,020	0,01514
Kyselina citronová (M)	0,020	0,01391
KH_2PO_4 (M)	0,020	0,01264
HCl (M)	0,035	0,03

Složka B (alkalický pufr)

	Příklad 2A složení	Optimální složení
TRIS (M)	0,020	0,01237
Kyselina boritá (M)	0,020	0,01397
Butylamin (M)	0,020	0,01514
K_3citrát (M)	0,020	0,01391
K_2HPO_4 (M)	0,020	0,01264
KOH (M)	0,020	0,02

Složení gradientu:

	Příklad 2A složení	Optimální složení
Základní elektrolyt (KCl, M)	0,00	0,010
Střed. iontová síla (M)	0,197 ± 0,049	0,150 ± 0,034
Lineární rozmezí pH	3 - 11	3 - 11
Korelační koef. (R^2)	-0,999801	-0,999870
Sklon	-8,296101	-9,535502
Intercept	11,148199	11,820707
Efektivní hodnota odchylky (RMSD)	0,047062	0,0376603
Střední kapacita pufru	0,016 ± 0,002	0,011 ± 0,001

Provedení postupu:

Na počátku se složka B pufru vstřikuje rychlostí 1 ml/min do proudu kapaliny a vzorek se vstřikuje z automatického zařízení pro odběr vzorků CAVRO při rychlosti průtoku 0,25 ml/min, takže celkový proud je 1,25 ml/min. Před každým pokusem se zaznamenává průběh ve tmě při vypnuté lampě. Jakmile proud kapaliny dosáhne průtokové komůrky Hellma (model 178.713, délka průtoku 10 mm, objem 8 mikrolitrů), zapne se deuteriová lampa (Cathodeon) ze zdroje proudu Cathodeon C720, kterým je deuteriová lampa a zaznamenává se referenční spektrum v přítomnosti vzorku a pufru B. Pak se v průběhu 240 sekund vytváří gradient, při němž se obě složky pufru lineárně mění v průběhu času v převráceném poměru, přičemž se vychází ze složky B, kterou je alkalický pufr a postupně se přidává složka A, kterou je kyselý pufr, takže na konci období 240 sekund již proud kapaliny obsahuje pouze pufr A. Rychlost průtoku se udržuje na hodnotě 1 ml/min. Po ukončení gradientu se pufr A se vzorkem ještě nechají krátkou dobou procházet tak, aby konec gradientu prošel průtokovou komůrkou před opětným průtokem pufru B, čímž se obnoví počáteční podmínky tak, že je možno vstříknout nový vzorek.

Po zapnutí lampy se spektrum zaznamenává v intervalech 0,5 sekund po celé trvání gradientu při použití fotodiodového uspořádání Zeiss při 256 vlnových délkách a příslušné elektroniky. Každé spektrum je zaznamenáváno jako 5 hodnot při integrační době 50 milisekund a zaznamenává se energie v diodovém kanálu, od níž byl odečten proud, zaznamenávaný v temnu.

Standardy a kalibrace:

Pro každý vzorek ze zařízení pro automatický odběr vzorků se použijí 4 standardy, jejichž hodnoty pKa jsou z literatury známé: jde o kyselinu benzoovou, pKa 3,96, hydrogenftalát draselný, pKa 4,87, p-nitrofenol, pKa 6,90 a fenol, pKa 9,72. Lineární regresí známých hodnot pKa pro standardní látky proti času do dosažení maxima při první derivaci křivky absorbance pro tyto látky se získá kalibrační křivka, kterou je možno použít pro stanovení hodnoty pKa pro neznámé látky. Spolu s každým vzorkem se také nechá projít několik slepých vzorků, obvykle jde o deionizovanou vodu, takto získané pozadí se pak odečítá od naměřené absorbance.

Příprava vzorku:

Obvykle se postupuje tak, že se vzorek 1 až 10 mg materiálu naváží do lahvičky, v níž je vloženo 1 ml metanolu, vzorek se rozpustí a pak se přidá 10 ml deionizované vody. Roztoky se naberou do injekčních stříkaček pro jedno použití s objemem 5 ml a rozdělí se přímo do zkumavek přes nylonové filtry pro jedno použití k odstranění nerozpuštěného materiálu. Zkumavky se pak přímo vloží do zařízení pro automatický odběr vzorků Cavro pro analýzu vzorků. Vzorek tvoří 20 % objemu protékající kapaliny, takže typická koncentrace vzorku v průtokové komůrce detektoru je 10^{-3} až 10^{-5} M.

Zpracování dat:

Prvním stupněm je vytvořit stupnici pH při použití času pro dosažení maxima při první derivaci křivky absorbance. Užije se několik vlnových délek. Délka pro kyselinu benzoovou je 235 nm, pro KHP je 278 nm, pro p-nitrofenol je 321 nm a pro fenol 235 nm a energetická spektra se převedou na absorbanci podle rovnice

A = log10 (I(ref) - I(dark))/(I(sample) - I(dark))

kde:

I(sample) je intenzita energie v gradientu se vzorkem pro určitý kanál nebo vlnovou délku,

I(dark) je proud za temna a

I(ref) je počáteční referenční hodnota pro pufr B se vzorkem.

Nejprve se zpracovávají slepé zkoušky a výsledek se odečítá ze všech vzorků a spekter pro standardní látky. Doby do dosažení vrcholu pro standardní látky se vynesou proti známým hodnotám pKa a výsledek se uloží do souboru jako kalibrační křivka. Pro daný soubor pokusných podmínek bylo prokázáno, že kalibrační rovnice pro regresi je stálá po celé týdny, takže není zapotřebí vytvářet kalibrační křivky denně.

Jakmile byla stanovena tímto způsobem hodnota pH na počátku a na konci gradientu, je možno zpracovat údaje pro vzorek. Obvykle se vybere až 20 vlnových délek, rovnoměrně od sebe vzdálených v rozmezí 210 až 350 nm pro analýzu vzorku a hodnoty pro energii se svrchu uvedeným způsobem převedou na hodnoty absorbance. Je také možno vybrat oblast spektra, v níž k absorpci nedochází, obvykle 420 až 440 nm a provede se oprava na jakýkoliv posun s ohledem na výsledek slepé zkoušky. Pak se užije analýza TFA pro stanovení hodnot pKa pro jednotlivé vzorky. Je také možno použít metodu první derivace pro vzorky, v nichž se hodnoty pKa nepřekrývají.

Dále budou uvedeny výsledky pro řadu sloučenin. Tyto výsledky byly získány na zařízení z obr. 8 při použití optimalizovaného složení pufrů, a to při vytvoření první derivace i při zpracování vzorku analýzou TFA. Výsledky jsou uvedeny současně se srovnáním s hodnotami pKa

pro tytéž látky, tak jak jsou uvedeny v literatuře. Výsledky ukazují, že došlo k přesnému stanovení těchto hodnot pro řadu sloučenin i v případech, kdy se toto stanovení považuje za obtížné.
Kalibrační křivka: pH = -0,021 x čas + 12,49 (R^2 = 0,9950)

	pKa
KHP	4,878
fenol	9,721
kyselina benzoová	3,964
p-nitrofenol	6,869

Výsledky: (graficky na obr. 25)

Vzorek	pKa (z literatury)	pKa (TFA)	pKa (1.derivace)
Kys. benzoová	39,8 ± 0,02[a]	3,99 ± 0,04	3,75 ± 0,04
Kys.fenyloctová	4,07[b]	4,34 ± 0,01	N.A.[d]
Kys.trans-skořicová	4,20[b]	4,15 ± 0,01	3,90 ± 0,17
Kys. 4-aminobenzoová	2,46 ± 0,01[a]	2,22 ± 0,05	2,45 ± 0,06
	4,62 ± 0,01[a]	4,79 ± 0,04	4,48 ± 0,08
Kys. 3-aminobenzoová	3,15 ± 0,01[a]	3,39 ± 0,08	2,95 ± 0,09
	4,53 ± 0,01[a]	4,73 ± 0,05	4,35 ± 0,13
Kys. 2-aminobenzoová	2,15 ± 0,01[a]	1,99 ± 0,09	2,28 ± 0,21
	4,75 ± 0,01[a]	4,75 ± 0,03	4,51 ± 0,09
4-chlorfenol	9,17[b]	9,03 ± 0,03	9,16 ± 0,08
Kys. 4-hydroxybenzoová	4,33 ± 0,01[a]	4,22 ± 0,05	4,08 ± 0,12
	8,97 ± 0,01[a]	9,10 ± 0,02	9,13 ± 0,17
Sotalol	8,28 ± 0,01[a]	7,96 ± 0,03	8,17 ± 0,12
	0,72 ± 0,01[a]	N.A.	N.A.
Fenolftalein	8,83 ± 0,08[c]	8,84 ± 0,05	N.A.
	9,32 ± 0,10[c]	9,32 ± 0,05	9,25 ± 0,10

[a]měřeno pH-metrem při 25 °C a iontové síle 0,15 M

[b]podle Albert a Serjeant, 1984, opravené na iontovou sílu 0,15 M

[c]Mchedlovpetrosyan a další, J. Anal. Chem. USSR, 1984, 39, 1105, měřeno spektrofotometricky při 25 °C a iontové síle 0,2 M

[d]údaje nejsou k dispozici

Kalibrační křivka: pH = -0,022 x čas + 12,66 (R^2 = 0,9955)

	pKa
KHP	4,878
fenol	9,721
kyselina benzoová	3,964
p-nitrofenol	6,869

Výsledky: (graficky na obr. 26)

Vzorek	pKa (literatura)	pKa (TFA)	pKa (1.derivace)
4-chlorfenol	9,17[a]	9,04 ± 0,01	9,25 ± 0,07
Sotalol	8,28 ± 0,01[b]	7,99 ± 0,03	8,12 ± 0,20
	9,72 ± 0,01[b]	N.A.[c]	N.A.
Kys. transstyryloctová		4,57 ± 0,05	N.A.
Pyridin	5,23[a]	5,27 ± 0,10	5,14 ± 0,22
Benzylamin	9,34[a]	9,23 ± 0,10	N.A.
Fenylethylamin	9,83[a]	9,64 ± 0,07	N.A.
Tryptamin	10,20[a]	9,67 ± 0,03	10,05 ± 0,10
1-(3-aminopropyl)		5,73 ± 0,08	5,81 ± 0,40
imidazol		9,28 ± 0,17	N.A.
Chinin	4,24 ± 0,09[b]	4,30 ± 0,09	3,77 ± 0,28
	8,55 ± 0,04[b]	8,27 ± 0,10	8,35 ± 0,23
Serotonin	9,80[a]	N.A.	N.A.
	10,04[a]	10,09 ± 0,03	10,03 ± 0,08

[a]Albert a Serjeant, 1984, opraveno na iontovou sílu 0,15 M
[b]měřeno pH-metrem při 25 °C a iontové síle 0,15 M
[c]není k dispozici

Podobným způsobem bylo podrobeno zkouškám 35 sloučenin na zařízení z obr. 8 při použití pufrů z pokusů 2A. Získané údaje byly zpracovány tak, že byla vytvořena první derivace křivky. Výsledky byly srovnávány s údaji z literatury pro tytéž látky. Byly vybrány sloučeniny se širokým rozmezím hodnot pKa, aby bylo možno prokázat přesnost kontinuální titrace v rozsáhlé oblasti pH. Výsledky jsou uvedeny graficky na obr. 27.

Jak je zřejmé z obr. 25 až 27, je kontinuální titrace přesným způsobem stanovení hodnot pKa v širokém rozmezí pH a pro sloučeniny s větším počtem hodnot pKa, jejichž stanovení běžnými postupy je velmi obtížné.

Příklad 3

Stanovení dělení na micely

Důležitou vlastností některých molekul farmaceuticky účinných látek je skutečnost, že mohou procházet nebo podléhat dělení na některých bariérách, např. fosfolipidových membránách. Obvykle dochází k tomu, že jeden z ionizačních stavů dané molekuly bariérou prochází účinněji než druhý z ionizačních stavů. Při daném pH dochází k ionizaci určitého stálého podílu molekul v roztoku, avšak jednotlivé molekuly mění svůj stav mezi ionizovaným a neionizovaným stavem. V případě, že např. neionizovaná forma má větší tendenci se dělit na micely, pak přidáním micel způsobí pokles koncentrace tohoto typu molekul ve volném roztoku vzhledem k tomu, že tyto molekuly přejdou do micel. Dynamická rovnováha mezi ionizovaným neionizovaným stavem molekul se s ohledem na tuto skutečnost upraví poklesem koncentrace ionizovaných molekul a vzestupem koncentrace neionizovaných molekul, až dojde k počátečnímu rovnovážnému stavu.

Tzn., že pozorovaná zjevná hodnota pKa se posune v případě, že se gradient pH nechá probíhat v přítomnosti micel. Výsledkem je tedy posun hodnoty pKa pro tyto látky, je možno pozorovat stoupnutí v kyselém prostředí a pokles v alkalickém prostředí. V tomto případě je možno log P pro tyto látky odvodit přímo z posunu zjevné hodnoty pKa při znalosti objemových poměrů obou fází. Předpokladem pro tento přístup je, aby se absorpční vlastnosti molekul podstatně neměnily mezi jednotlivými fázemi.

Tuto skutečnost je možno sledovat při použití kontinuální titrace a svrchu uvedeného zařízení tak, že se do gradientu zařadí čtvrtá složka. Tato složka je tvořena micelami, vytvořenými ze smáčedel, např. dodecyl síranu sodného SDS. Koncentrace smáčedla v této složce musí být dostatečně vysoká, tak aby ve výsledném proudu všech složek bylo smáčedlo přítomno v přebytku s ohledem na svou kritickou koncentraci micel CMC a došlo skutečně ke tvorbě micel.

Aby bylo možno stanovit rozdělení, je nutno udržet množství suspenze micel konstantní v průběhu gradientu pH. Koeficient dělení je pak možno stanovit z následující rovnice

log P = log (delta pKa (Vw/Vo))

kde

delta pKa je rozdíl mezi pKa v přítomnosti a nepřítomnosti micel,

Vw je objem vodné fáze,

Vo je objem organické fáze (micely).

Hodnotu Vo je možno vypočítat z CMC, průměru micel a z agregačního čísla pro smáčedlo, které uvádí počet molekul, nezbytných pro vytvoření každé micely. Jde o faktory, které jsou k dispozici nebo je možno je snadno vypočítat.

Dělení kyseliny benzoové do micel SDS

Účelem tohoto pokusu bylo pozorovat dělení do micel při použití kontinuální titrace. Bylo použito zařízení z příkladu 1, znázorněné schematicky na obr. 2.

Byly použity 4 koncentrace SDS, připravené ze zásobního roztoku s koncentrací 0,1 M ve vodě.

Byly připraveny následující vzorky, vždy s objemem 20 ml.

Vzorek	Objem SDS (ml)	Objem kys. benzoové (ml)	Objem H_2O (ml)	Konc. SDS (M)	Konc. kys. benzoové (mM)
A	0	20	0	0	0,77
B	20	0	0	0,01	0
C	20	0*	0	0,01	~0,7
D	15	0	5	0,075	0
E	15	5	0	0,075	0,19
F	10	0	10	0,05	0
G	10	10	0	0,05	0,39
H	5	0	15	0,025	0
I	5	15	0	0,025	0,58

*~0,5 mg pevné kyseliny benzoové

Kontinuální titrace byla prováděna v následujícím pořadí:

1. Slepá zkouška (voda)
2. Slepá zkouška (voda)
3. Slepá zkouška (voda)
4. STD1
5. STD2
6. A
7. B
8. C
9. D
10. E
11. F
12. G
13. H
14. I
15. STD1
16. STD2
17. Slepá zkouška (voda)
18. Slepá zkouška (voda)

Lahvičky bez obsahu kyseliny benzoové (slepé zkoušky pro SDS) neměly žádné titrační křivky a byly proto vynechány z dalšího zpracování. Šlo o lahvičky 7, 9, 11 a 13.

Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce:

Standardní křivka

Lahvička		Sloučenina	pKa	Doba do vrcholu
4	STD1	KHP	4,878	299,5
		fenol	9,721	447,8
5	STD2	kys.benzoová	3,964	272
		p-NO_2 fenol	6,869	363,8
15	STD1	KHP	4,878	300,5
		fenol	9,721	448,5
16	STD2	kys.benzoová	3,964	272,5
		p-NO_2 fenol	6,869	363,5

Intercept = -4,9325

Sklon = 0,0326

Vzorky

Lahvička	Sloučenina (konc. SDS)	Doba do vrcholu	pKa 1	Delta pKa
6	kys. benzoová (0,0 M)	271	3,91	
8	kys. benzoová (0,02 M)	275,8	4,07	0,16
10	kys. benzoová (0,015 M)	275,8	4,07	0,16
12	kys. benzoová (0,01 M)	274,5	4,02	0,11
14	kys. benzoová (0,005 M)	274	4,01	0,10

Výpočet log P

log P = log (delta pKa (Vw/Vo))

kde

delta pKa je rozdíl mezi pKa v přítomnosti a nepřítomnosti micel,

Vw je objem vodné fáze,

Vo je objem organické fáze (micely).

Pro tento pokus je Vo považováno za objem micel SDS.
Iontová síla byla 0,1 M (iontová síla proudu pufru).
Průměr micel = $2,5 \times 10^{-9}$ m
číslo agregace = ~100
kritická koncentrace micel = 1,5 mM.

Tyto údaje byly získány z publikace Van Os N. M. a další: Physico-chemical properties of selected Anionic, Cationic and non-ionic surfactants, Elsevier ISBN: 0-444-89691-0.

Ve všech smáčedlech, která byla svrchu uvedena je CMC přítomno ve formě micel, takže ze svrchu uvedených informací je možno vypočítat objem micel SDS pro každý roztok.

Objem koule

$$V = \frac{4\pi r^3}{3} = 6.54 \times 10^{-26} m^3$$

Bylo prokázáno, že výsledky těchto pokusů byly velmi přesné a bylo možno pozorovat stálý posun v hodnotách pKa, a to ve všech koncentracích SDS.

Tyto výsledky tedy prokazují, že způsob kontinuální titrace je možno využít ke stanovení dělení látek do organizovaných organických fází, např. do micel.

Vzorek	pKa	Konc. SDS (M)	Přebytek SDS (M)	Molekuly SDS	Micely SDS	Objem SDS (ml)	Objemový poměr	Delta pKa	P	log P
Kys. benzoová	3,91									
Kys. benzoová v 0,1 M SDS	4,07	0,02	0,0185	$1,11x10^{22}$	$1,11x10^{20}$	0,00729	137,5	0,16	21,96	1,34
Kys. benzoová v 0,075 M SDS	4,07	0,015	0,0135	$8,13x10^{21}$	$8,13x10^{19}$	0,00532	188,08	0,16	30,09	1,48
Kys. benzoová v 0,05 M SDS	4,02	0,01	0,0085	$5,12x10^{21}$	$5,12x10^{19}$	0,00335	298,72	0,11	32,86	1,52
Kys. benzoová v 0,025 M SDS	4,01	0,005	0,0035	$2,11x10^{21}$	$2,11x10^{19}$	0,00138	725,46	0,1	72,55	1,86

Průměrný log P = 1,55

Standardní odchylka 0,11

Příklad 4.

Koncový bod titrace - zařízení z obr. 2

Řada tradičních kvantitativních titrací, např. stanovení koncentrace určité látky v roztoku závisí na odečtení koncového bodu titrace vizuálně příslušným pracovníkem. Přesnost těchto postupů je proto silně závislá na zkušenosti pracovníka a na interpretaci koncového bodu titrace. Při použití kontinuální titrace pomocí gradientu se spektroskopickou detekcí koncového bodu se stává detekce koncového bodu nezávislá na zkušenosti odborných pracovníků. Tento postup je možno zvláště dobře použít pro látky s jedinou ionizovatelnou skupinou nebo s malým počtem pKa, které se nepřekrývají.

Jako příklad použití tohoto postupu je možno uvést stanovení koncentrace hydrogenftalátu draselného, KHP při použití fenoloftaleinu jako indikátoru. Uvedená látka je v roztoku silně kyselá. Je proto možno ji kvantitativně stanovit titrací proti silné zásadě. Po spotřebování veškerého množství KHP dojde ke silnému vzestupu pH, který je možno prokázat barevnou změnou fenoloftaleinového indikátoru, který se v tomto okamžiku změní z bezbarvé látky na růžovou, k této změně dochází při pH 8,4 až 10,0.

Při provádění titrace s použitím gradientu byla rozpuštěná látka KHP vstříknuta do proudu v přístroji z obr. 2 tak, že tvořila 20 % výsledné směsi, stejně jako zkoumaná látka v příkladu 2. Obě složky gradientu, z nichž jedna měnila své množství z 80 % k 0 a druhá od 0 do 80 %, byly 0,05 M KOH a voda. Koncový indikátor byl dodáván spolu s proudem vzorku tak, že byly přidány 2 kapky fenolftaleinu do 20 ml roztoku vzorku.

Rozpuštěný KHP byl tedy titrován proudem KOH. Jakmile byla veškerá sloučenina spotřebována, došlo k silnému vzestupu pH a k rychlé změně ionizačního stavu indikátoru a tím i k rychlé změně barvy. Systém byl kalibrován při použití standardního roztoku KHP se známou koncentrací.

Použité chemické látky

- 0,05 M KOH - kanál B

bylo použito 50 ml 0,5 M KOH (Aldrich) po zředění na 500 ml vodou

- 0,27 g fenoloftaleinového indikátoru bylo zváženo a rozpuštěno v 10 ml metanolu a v 10 ml vody. Vysráželo se malé množství materiálu.

- roztok KHP 0,1416 M.

Bylo vytvořeno sériové zředění tak, že byly získány následující roztoky KHP:

0,1416 M

0,0708 M

0,0354 M

0,0177 M

0,0089 M

Tyto standardní roztoky byly nality do scintilačních nádobek a do každé nádobky byly přidány 2 kapky indikátoru. Pak byly provedeny slepé zkoušky a zkoušky se vzorky. Absorbance byla měřena při vlnové délce 240 nm.

Výsledky těchto zkoušek jsou graficky znázorněny na obr. 16. Doby, které uplynuly do dosažení vrcholu pro slepou zkoušku a pro standard, byly pak analyzovány pomocí regrese koncentrace KHP proti době, po níž byl použit gradient. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce:

Stanovení KHP titrací s kontinuálním gradientem

Koncentrace KHP (M)	Doba do vrcholu
0,1416	398
0,0708	292
0,0354	241
0,0177	216,5
0,0089	203,5
0	186,5

Bylo dosaženo velmi dobré regrese při vysoké statistické významnosti r^2 = 0,9996, F = 10337. Vzniklá kalibrační křivka je znázorněna na obr. 17. Neznámou koncentraci roztoku KHP, který se titruje při použití téhož gradientu, je možno stanovit z této první derivace doby do vrcholu absorbance při použití takto vytvořené kalibrační křivky.

Uvedený pokus prokazuje použitelnost titrace s kontinuálním gradientem pro stanovení klasického koncového bodu titrace. Tento přístup má proti známým přístupům několik výhod:

1. rychlé provedení
2. velmi přesné stanovení koncového bodu
3. odstranění nutnosti odborné práce
4. použití pro velký rozsah.

Příklad 5

Stanovení koncového bodu pro KHP - zařízení z obr. 8

Roztoky

Fenolftaleinový indikátor:

0,33 g fenolftaleinu se rozpustí ve směsi 10 ml metanolu a 10 ml vody. Přebytek fenolftaleinu v průběhu času vytvoří sraženinu.

Roztok KOH pro titraci:

50 ml 0,5 N KOH (Aldrich se zředí 500 ml destilované vody, čímž se získá zásobní roztok s koncentrací 0,05 N KOH.

Zásobní roztok KHP:

7,723 g KHP s molekulovou hmotností 204,23 se rozpustí ve 250 ml vody na roztok s koncentrací 0,15126 M.

Z tohoto zásobního roztoku KHP se pak připraví řada standardních roztoků této látky:

Standard	Objem zásobního roztoku	Objem vody	Konečná koncentrace
A	2 ml	8 ml	0,030252M
B	4 ml	6 ml	0,060504M
C	6 ml	4 ml	0,090756M
D	8 ml	2 ml	0,121008M
E	10 ml	0 ml	0,151260M

Vzorky KHP:

Ze zásobního roztoku KHP byla připravena řada vzorků, jejichž koncentrace byla ověřena až po ukončení pokusu.

Standard	Objem zásobního roztoku	Objem vody	Konečná koncentrace
1	2,3 ml	10ml	0,028M
2	3,98ml	10ml	0,043M
3	1,86ml	10ml	0,024M
4	3,3ml	10ml	0,038M
5	4,32ml	10ml	0,46M
6	1,65ml	10ml	0,021M

Podmínky pokusu:

Detektor DAD 440

Detektor s diodovým uspořádáním byl nastaven tak, aby zaznamenal absorpci při 4 vlnových délkách, 540 nm, 550 nm, 560 nm a 570 nm.

Vstřikovací zařízení:

Rozpouštědlo A: voda

Rozpouštědlo B: 0,05 N KOH

Rozpouštědla byla přidávána z injekční stříkačky s objemem 5 ml. Rychlost průtoku měřící komůrkou byla 0,8 ml/min. Doba trvání gradientu byla 240 s, před gradientem uplynula doba 75 s a po gradientu 90 s, načež byla ponechána doba 45 s do nastavení původních podmínek, takže celý pokus trval 7,5 min.

Zařízení pro automatický odběr vzorků bylo nastaveno na rychlost 0,2 ml/min a na cyklus 7,5 minuty. Slepé zkoušky, standardy a vzorky byly ke zkouškám použity v následujícím pořadí:

1	Slepá zkouška	10	Vzorek 2	19	Vzorek 5
2	Slepá zkouška	11	Vzorek 3	20	Vzorek 6
3	Slepá zkouška	12	Vzorek 4	21	Slepá zkouška
4	Standard A	13	Vzorek 5	22	Standard A
5	Standard B	14	Vzorek 6	23	Standard B
6	Standard C	15	Vzorek 1	24	Standard C
7	Standard D	16	Vzorek 2	25	Standard D
8	Standard E	17	Vzorek 3	26	Standard E
9	Vzorek 1	18	Vzorek 4	27	Slepá zkouška

Pro odečítání dat bylo použito zařízení Dasylab, analýza byla prováděna při použití první derivace při trojnásobném vyrovnání údajů. Získané hodnoty byly analyzovány při 540 nm.

Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce.

Lahvička	Vzorek (M KHP)	Doba do první derivace maxima	Koncentrace KHP (M) z křivky standardu
1	Slepá zk. 0,000		
2	Slepá zk. 0,000		
3	Slepá zk. 0,000	129,8	
4	A 0,03	159,0	
5	B 0,061	189,8	
6	C 0,091	224,5	
7	D 0,121	258,5	
8	E 0,151	295,8	
9	S1	155,3	0,023
10	S2	167,0	0,034
11	S3	152,3	0,020
12	S4	162,3	0,029
13	S5	169,5	0,036
14	S6	151,8	0,020
15	S1	155,0	0,023
16	S2	165,5	0,032
17	S3	152,3	0,020
18	S4	162,0	0,029
19	S5	170,0	0,036
20	S6	151,0	0,019
21	Slepá zk. 0,000	129,3	0,000
22	A 0,030	158,8	
23	B 0,061	189,5	
24	C 0,091	224,5	
25	D 0,121	259,5	
26	E 0,151	295,0	
27	Slepá zk. 0,000	131,7	

Byla vytvořena standardní křivka, tak jak je znázorněno na obr. 19, kterou je možno vyjádřit rovnicí

$y = 0,009 x - 0,1166$ $R^2 = 0,998$

Při použití kalibrační křivky, vytvořené s použitím standardních roztoků je možno vypočítat doby do dosažení maxima při první derivaci pro každý vzorek a tyto hodnoty převést na koncentraci jednotlivých vzorků. Výsledky, které jsou průměrem ze dvou stanovení se pak srovnávají s vypočítanou koncentrací vzorků, jak je uvedeno v následující tabulce:

Vzorek č.	Vypočítaná koncentrace	Stanovená koncentrace
1	0,028	0,023
2	0,043	0,033
3	0,024	0,020
4	0,038	0,029
5	0,046	0,036
6	0,021	0,020

Příklad 6

Komplexometrická titrace zinečnatých iontů při použití EDTA a xylenolového oranžového indikátoru

Jde o modifikaci způsobu, který byl vyvinut S. G. Novickem pro stanovení zinku v tabletách proti krčním zánětům a byl popsán v J. Chem. Ed, svazek 72 (12), 1463, 1997.

Zinečnaté ionty vytváří s xylenolovým oranžovým indikátorem komplex, jímž se barva změní na intenzivně červenou v případě absorbce při 580 nm. Při titraci kyselinou ethylendiamintetraoctovou, EDTA vytváří zinečnaté ionty přednostně komplex s touto látkou. Po spotřebování všech zinečnatých iontů se pak oranžová xylenolová

barva nachází ve volné formě, která je žlutá a současně je možno pozorovat odpovídající pokles absorbance při 580 nm.

Roztoky

Xylenolový oranžový indikátor:

0,1% ve vodě = 100 mg ve 100 ml

Roztok EDTA:

Při výrobě 500 ml zásobního roztoku s koncentrací 18,75 mM se postupuje tak, že se 3,485 g EDTA.2Na.2H_2O s molekulovou hmotností 372,24 rozpustí v 500 ml vody.

Standardy zinku:

Dusičnan zinečnatý byl zvolen jako sůl pro standardní roztoky. Koncentrace zinku v proudu kapaliny musí být nižší než maximální koncentrace EDTA, aby bylo zajištěno, že se veškerý zinek účastní tvorby komplexu s EDTA a určitý podíl indikátoru zůstane ve volné formě, nevytvářející komplex. Při maximálním množství bude tvořit roztok EDTA 80 % proudu kapaliny při koncentraci 18,72 x 0,8, tzn. 14,976 mM.

Tzn., že koncentrace zinečnatých iontů v proudu kapaliny musí být nižší než uvedená hodnota 14,976 mM. Vzorky s obsahem zinku budou tvořit 20 % proudu kapaliny, takže maximální koncentrace zinečnatých iontů ve vzorcích musí být 14,976 x 100 + 5 = 74,88 mM. Postupuje se tak, že se zváží 1,03 g $Zn(NO_3)_2.6H_2O$ a toto množství se rozpustí v 50 ml 0,1 N acetátového pufru o pH 4,9, čímž se získá zásobní roztok zinku s koncentrací 69,25 mM. Z tohoto roztoku se připraví následující standardy:

Standard*	Objem zásobního roztoku (ml)	Objem vody (ml)	Koncentrace (mM)
A	2	8	13,85
B	4	6	27,70
C	6	4	41,55
D	8	2	55,40
E	10	0	69,25

*200 mikrolitrů xylenolového oranžového indikátoru se přidá ke každému standardu

Gradient:

Stříkačka A: voda

Stříkačka B: zásobní roztok EDTA 18,72 mM

Rychlost průtoku: 0,8 ml/min

Doba trvání gradientu:

240 sekund trvá průchod roztoku 100 % A a 100 % B, přičemž před gradientem se zařadí 75 sekund, v nichž prochází pouze roztok ze stříkačky A, mimo to prochází 90 sekund po průchodu gradientu pouze roztok ze stříkačky B a mimo to se zařazuje doba regenerace 45 sekund (stříkačka A). Tím vzniká celková doba cyklu 7,5 minut.

Zařízení pro automatický odběr vzorků se nastaví na délku cyklu 7,5 minut při rychlosti změny 0,2 mM za minutu a standardy se nechají probíhat proti gradientu EDTA k získání kalibrační křivky, která znázorněna na obr. 20. Doby do dosažení vrcholu pro první derivaci absorbance při vlnové délce 570 nm byly následující:

Lahvička	Roztok	Doba do dosažení vrcholu
1	Slepá zkouška	-
2	Slepá zkouška	-
3	Standard A	165,3
4	Standard A	165,8
5	Standard B	194,0
6	Standard B	194,0
7	Standard C	221,0
8	Standard C	223,7
9	Standard D	NF
10	Standard D	NF
11	Standard E	NF
12	Standard E	NF

NF = nebyla provedena aproximace křivky pro 1. derivaci

Aproximace křivky pro první derivaci nebylo možno uskutečnit v případě absorbance standardů s vysokou koncentrací. Příčinou je pravděpodobně příliš malé množství pufru ve standardních roztocích, v nichž z tohoto důvodu nedošlo k výrazné změně barvy xylenolového oranžového indikátoru. Pro první tři standardní roztoky, pro něž bylo možno získat příslušné výsledky, byla vytvořena lineární kalibrační křivka, tak jak je znázorněna na obr. 20. Tento pokus jasně prokazuje, že kontinuální titraci je možno využít i v případě komplexometrických titrací. V tomto případě byla kapacita pufru nedostatečná, tuto nevýhodu by však bylo možno odstranit použitím pufru pro tvorbu roztoku EDTA.

Příklad 7

Aplikace aproximace křivky na údaje o pKa, získané při kontinuální titraci

Získané údaje o absorbanci při kontinuálním titračním postupu při použití zařízení podle vynálezu je možno analyzovat metodou

tvorby první derivace, jak bylo svrchu podrobně vysvětleno. Aby bylo možno tento postup úspěšně využít, je nutno provést vyrovnání údajů, v důsledku tohoto postupu dochází ke ztrátě extrémních údajů při titraci. Metoda první derivace je velmi úspěšná v případě, že změny absorbance jsou velké, gradient pH je lineární a hodnoty pKa se nepřekrývají. Druhou možností je analýza typu TFA. Tento postup je vhodnější zejména v případě, že se hodnoty pKa překrývají, klade však větší nároky na počítač a vyžaduje, aby byly k dispozici spektrální údaje při několika vlnových délkách. Před zpracováním získaných údajů je také nutno mít k dispozici poznatky o ionizačním chování jednotlivých vzorků.

Třetím způsobem analýzy, který je možno aplikovat na údaje, získané při kontinuální titraci při použití spektroskopických metod je tzv. aproximace křivky. Tento postup je možno využít při malých spektrálních změnách, mimo to je tento postup poměrně neovlivnitelný gradientem pH, který není zcela lineární a při jeho provádění je možno mít k dispozici údaje při pouze jediné vlnové délce. Není zapotřebí provádět vyrovnání dat a nejsou kladeny velké nároky na počítač. V následujícím příkladu byly údaje o absorbanci při titraci vzorku sloučeniny S získány při využití lineárního gradientu pH způsobem podle příkladu 2. Údaje byly zpracovány dále uvedeným způsobem. Celkem byly získány údaje při 4 vlnových délkách. Byla stanovena minimální a maximální absorbance pro každou vlnovou délku a z údajů byla vytvořena stupnici v rozmezí 0 až 1 při použití rovnice

$$Abs_{new} = \frac{Abs_{obs} - Abs_{min}}{(Abs_{max} - Abs_{min})}$$

Spektrální změnu je možno definovat jako logistickou funkci:

$$Abs = \frac{A}{(1+B^{(-D*x)})}$$

kde A, B a D jsou konstanty a x je závislá proměnná. V dále uvedeném příkladu byly hodnoty A, B a D zjištěny pokusem a omylem a x znamená čas. Aproximace údajů byla provedena s ohledem na spektrální údaje při použití příslušné pomocné funkce v programu Microsoft Excel při minimalizaci zbývajících hodnot čtverců a při úpravě hodnot A, B a D.

V následující tabulce jsou shrnuty údaje, získané pro 4 vlnové délky

Vlnová délka	A	B	D	RSS
240	0,9713	0,0003	-0,0349	0,1660
265	0,9539	10609	0,0429	1,757
290	0,8372	$1,63E^{-5}$	-0,0455	3,4240
315	0,9577	0,00025	-0,0359	0,2528

V případě, že hodnota B je vysoká, zvyšuje se absorbance v průběhu času. V případě, že hodnota B je nízká, dochází k poklesu absorbance v průběhu času.

První derivace logistické funkce je definována jako:

$$Abs = \frac{A}{(1+B^{(-D \cdot x)})^2} .b^{(-D \cdot x)}$$

Při nalezení korelace mezi údaji pro maximum první derivace je možno údaje použít jako normální údaje pro první derivaci a provést kalibraci proti standardu se známou hodnotou pKa. Dále bude uvedeno shrnutí pro údaje o sloučenině S.

	240 nm	265 nm	290 nm	315 nm
Abs_{min}	-0,2315	-0,001	-0,00245	-0,00663
Abs_{max}	-0,00028	0,003967	0,0013	0,0043
Dosah	0,02286	0,00497	0,00378	0,00706

Z tabulky je zřejmé, že všechny spektrální změny jsou velmi malé.

	240 nm	265 nm	290 nm	315 nm
A	0,9713	0,9539	0,8372	0,95577
B	0,0003	10609	$1,63E^{-5}$	0,00025
D	-0,0349	0,0429	-0,0455	-0,0359
RSS	0,1660	1,757	3,4240	0,2528
Data pro max. 1. derivace	230	216	242	231

Při použití rozsahu při normalizaci hodnot je možno získat vážené průměry hodnot:

Vlnová délka	Dosah	Max 1. derivace
240	0,023	230
265	0,005	216
290	0,004	242
315	0,007	231
		Průměr: 229,75
		*Vážený průměr: 229,56

*Vážený průměr byl získán při použití příslušné funkce pro celkové množství produktu v programu Microsoft Excel™

Pro získané údaje jsou křivky po aproximaci a pro srovnání také křivky první derivace uvedeny pro každou vlnovou délku na obr. 21 až 24.

Příklad 8

Teoretické základy stanovení dělících koeficientů.

V případě, že se hodnoty pKa stanoví v přítomnosti nemísitelného rozpouštědla, dojde k posunu „zjevné" hodnoty pKa.

Tento posun je způsoben rozdělením sloučeniny do organické fáze. Velikost posunu je závislá na dělícím koeficientu pro danou látku a pro poměr objemu obou fází.

Dělicí koeficient log P je možno vypočítat z následující rovnice

$$\log P = \log (10^{ch(pKa-pKa')}-1)/R$$

kde

pKa = pKa ve vodě

pKa' = pKa v přítomnosti organické fáze

ch = náboj v molekule (-1 pro kyseliny, +1 pro baze)

R = objem poměru = objem organické fáze : objem vodné fáze

Tento model platí pouze pro monoprotické sloučeniny. V případě, že objemové poměry jsou ekvivalentní, je dělicí koeficient log P přibližně ekvivalentní rozdílu mezi pKa a pKa'.

Zařízení pro kontinuální titraci je možno použít pro stanovení hodnoty dělicího koeficientu tak, že se provádějí dvě titrace, z nichž první je standardní kontinuální titrace jako v příkladu 1 a druhá titrace probíhá po přidání oktanolu nebo jiné organické fáze, která je v proudu kapaliny ve styku s vodnou fází. V případě, že mezi oběma fázemi je v proudu kapaliny dostatečná plocha styku, dojde k dělení sloučeniny ze vzorku mezi obě fáze. Pak se vodná a organická fáze oddělí a proud vodné fáze se nechá projít detektorem.

Jedním z prostředků k provádění tohoto postupu je využití zařízení pro chemické zpracování látek, vyvinuté v CRL a BNFL. Zařízení je specificky upraveno tak, aby umožnilo současné proudění vodných a organických fází při vzájemném styku a pak úplné oddělení obou fází. Zařízení bylo popsáno v publikaci Eureka, Transfers Technology, říjen 1997, strana 42. V případě, že proudy obou fází postupují stejnou rychlostí, jde o běžný pokus, v němž jsou objemy

ekvivalentní. Spektrální údaje z takových pokusů je možno zpracovat následujícím způsobem:

Pro jakékoliv dané pH je možno vypočítat log D pro monoprotickou sloučeninu podle následující rovnice 1.

$$\log D = \log (10^{\log P} + 10^{\log P - \Delta + ch(pKa - pH)}) - \log (1+10^{(ch(pKa - pH))})$$

kde

log P = dělicí koeficient neionizované látky

delta = dělicí koeficient neionizované látky log P - log P ionizované látky

ch = náboj (-1 pro kyseliny, +1 pro baze)

pKa = pKa molekuly

Absorbanci roztoku pro jakékoliv dané pH je možno vypočítat z následující rovnice 2:

$$A = \frac{\% \text{ ionised}}{100} \times A_I + \frac{100 - \% \text{ ionised}}{100} \times A_0$$

kde

A_I = absorbance ionizované látky a

A_0 = absorbance neionizované látky

Při dělicím pokusu je možno koncentraci sloučeniny ve vodné fázi vypočítat z rovnice 3:

$$conc_{aq} = 1/10^{\log D} + 1$$

a koncentraci sloučeniny v oktanolové fázi z rovnice 4:

$$conc_{oct} = 1\text{-}conc_{aq}$$

Při kombinaci rovnic 2 a 3 je možno získat průběh absorbance vodné fáze v průběhu dělicího pokusu. Očekávané výsledky pro typické kyseliny a baze by byly obdobné výsledkům, znázorněným na obr. 28 a 29.

Je zřejmé, že by bylo možno navrhnout ještě celou řadu modifikací a změn. Např. by bylo možno místo kalibračního systému s použitím několika standardů, podrobených pokusu před zpracováním vzorků možno zařadit sloučeniny se známými hodnotami pKa přímo do roztoku vzorku a vytvořit tak vnitřní standard. Tímto způsobem by byly získány doby pro změny absorbance v případě známých hodnot pKa a proti těmto hodnotám by bylo možno srovnávat hodnoty, získané pro zkoumané látky. Je samozřejmé, že by bylo možno uskutečnit ještě řadu jiných změn, spadajících do běžné laboratorní praxe a rovněž spadajících do rozsahu vynálezu.

Zastupuje:

PV 2000 - 876

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob kontinuální titrace, při němž se nejméně jeden parametr nejméně jedné sloučeniny ve sledované směsi sleduje v průběhu změny směsi látek změnou koncentrace jedné nebo většího počtu složek v této směsi, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se kontinuálně mísí nejméně dvě složky proudu kapaliny za vzniku výsledného proudu, který se nechá projít spektrofotometrickou detekční oblastí, přičemž objemový poměr nejméně dvou složek, vytvářejících výsledný proud se kontinuálně a lineárně mění v průběhu času změnou relativního poměru složek výsledného proudu, přičemž celkový objem směsi zůstává konstantní.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se výsledný proud kapaliny vytváří ze tří kapalných složek, přičemž podíl jedné ze složek zůstává stálý a podíl druhé a třetí kapalné složky se mění v převráceném poměru.

3. Způsob kontinuální titrace, při němž se mísí proud zkoumané látky s nejméně jedním dalším proudem kapaliny za vzniku výsledného proudu, který se nechá projít spektrofotometrickou detekční oblastí a odečítají se hodnoty, odpovídající nejméně jednomu fyzikálnímu nebo chemickému parametru zkoumané látky, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se výsledný proud nechá projít spektrofotometrickou detekční zónou při konstantní rychlosti průtoku, přičemž rychlost průtoku nejméně dvou kapalných proudů, vytvářejících výsledný proud se v průběhu času kontinuálně a lineárně mění.

4. Způsob podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že měnitelnými složkami proudu jsou roztoky pufrů, roztoky reakčních činidel, vodná nebo organická rozpouštědla.

5. Způsob podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že proud obsahuje nejméně 2 variabilní složky, kterými jsou dva linearizované roztoky pufrů.

6. Zařízení k provádění způsobu podle nároků 1 až 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je tvořeno
a) nejméně dvěma vstupy, propojenými se společným kanálem,
b) detekční zónou, která je propojena se společným kanálem a s výstupem,
c) spektrofotometrickým detektorem pro monitorování proudu kapaliny v detekční zóně a odečítáním dat, vztahujících se nejméně na jednu chemickou nebo fyzikální vlastnost proudu kapaliny a
d) řídicími prostředky, spojenými se vstupy pro řízení relativního množství kapalin, dodávaných do společného kanálu každým vstupem pro možnost změny složení proudu v hlavním kanálu kontinuálně a lineárně v průběhu času.

7. Zařízení podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jako spektrofotometrický detektor obsahuje spektrofotometr pro viditelnou oblast nebo UV oblast záření, fluorimetr, polarimetr, kolorimetr, přístroj pro měření rozptylu světla, optické otáčení nebo cirkulární dichroismus.

8. Zařízení podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jako spektrofotometrický detektor obsahuje spektrofotometr pro viditelnou oblast nebo UV oblast záření.

9. Zařízení podle některého z nároků 6 nebo 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že řídicí prostředky, spojené se vstupy, jsou tvořeny automatickou stříkačkou, mísicím čerpadlem, peristaltickým čerpadlem nebo digitálním čerpadlem s ventilem nebo kombinací těchto prostředků.

10. Zařízení podle některého z nároků 6 až 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje zařízení pro automatické přivádění řady vzorků postupně do společného kanálu.

11. Zařízení podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zařízením pro automatické přivádění řady vzorků do společného kanálu je zařízení pro automatický odběr vzorků.

12. Zařízení podle některého z nároků 6 až 11 pro použití při stanovení pKa.

13. Způsob podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že výsledný proud kapaliny ve formě pufru je vytvořen z kyselé a alkalické složky, odvozené od téže sloučeniny, takže celkové chemické složení výsledného proudu zůstává v průběhu titrace konstantní a mění se relativní podíly obou linearizovaných pufrů.

14. Způsob podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, že kyselé a bazické složky zahrnují kyselinu citronovou, citronan draselný, KH_2PO_4, K_2HPO_4, HCl a KOH.

Zastupuje:

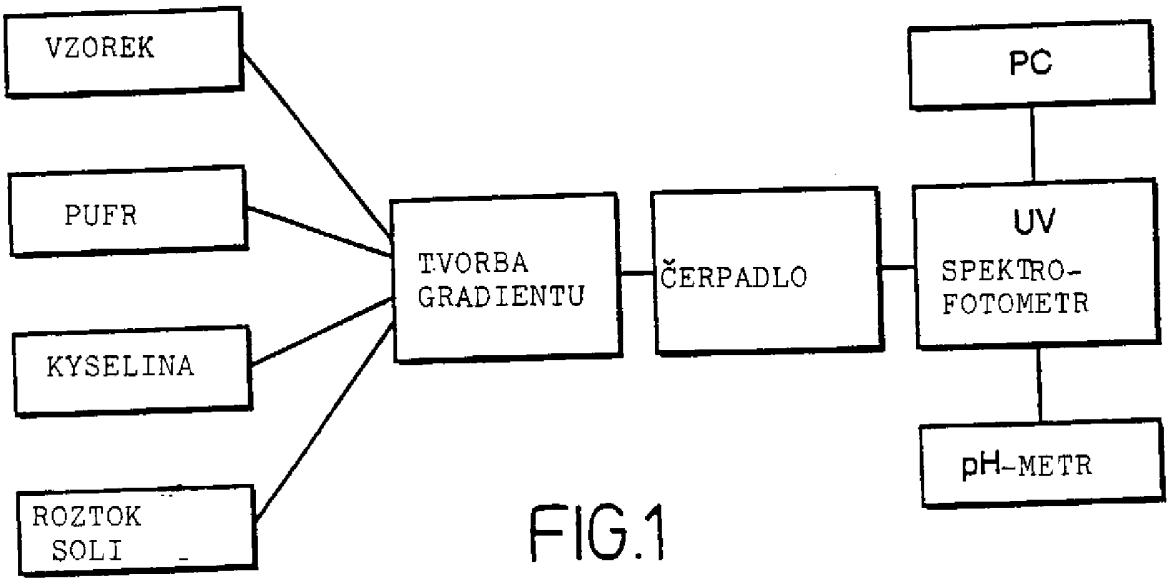

VZOREK
PUFR
KYSELINA
ROZTOK SOLI
TVORBA GRADIENTU
ČERPADLO
UV SPEKTRO-FOTOMETR
PC
pH-METR

FIG.1

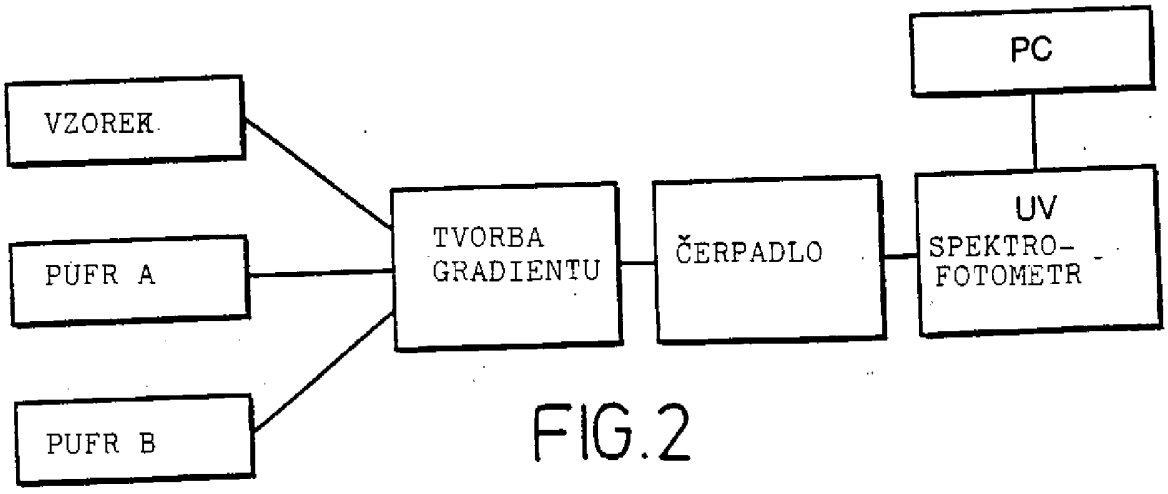

VZOREK
PUFR A
PUFR B
TVORBA GRADIENTU
ČERPADLO
UV SPEKTRO-FOTOMETR
PC

FIG.2

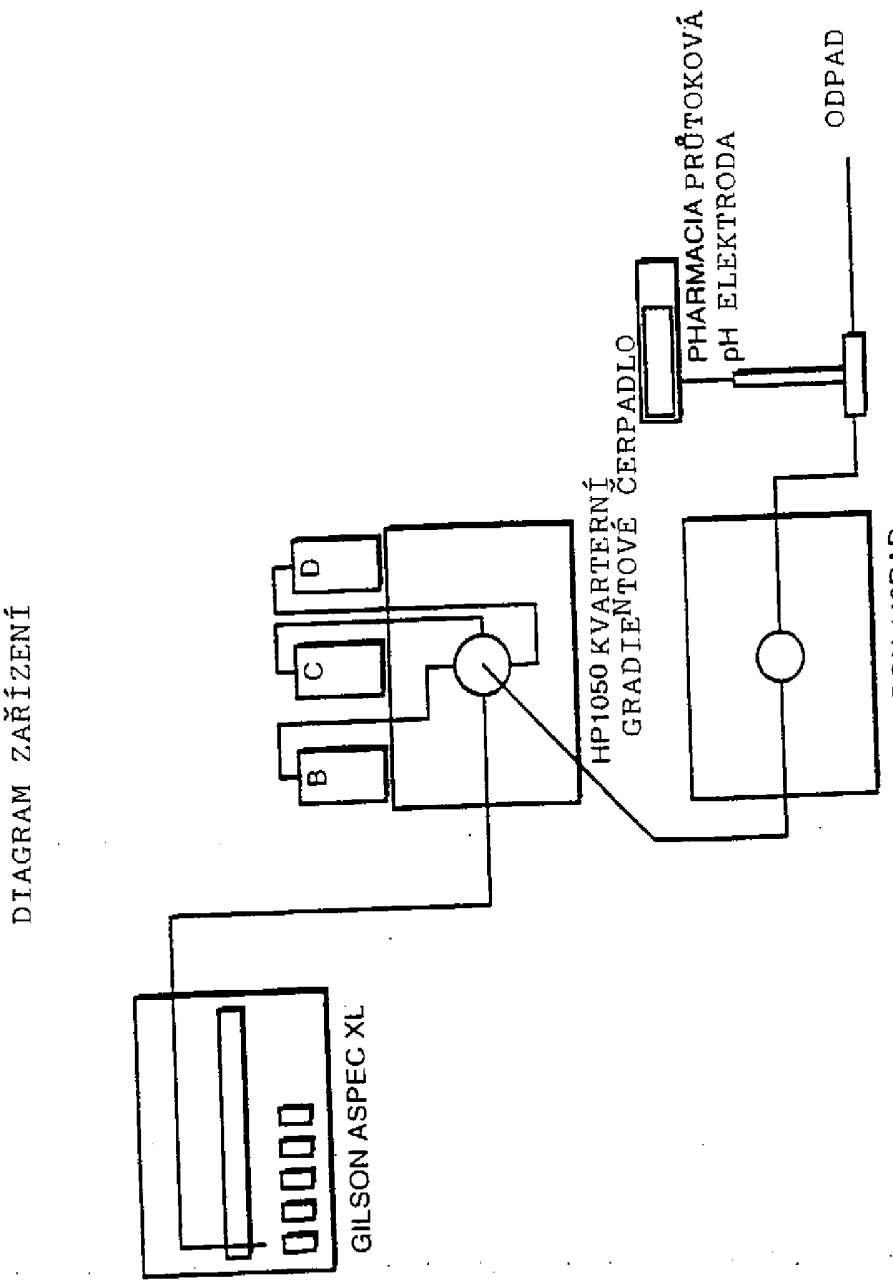


DIAGRAM ZAŘÍZENÍ
GILSON ASPEC XL
HP1050 KVARTERNÍ GRADIENTOVÉ ČERPADLO
PHARMACIA PRŮTOKOVÁ pH ELEKTRODA
ODPAD
KONTRON 440DAD
A
B
C
D

FIG.3

ELEKTRICKÉ PROPOJENÍ 1: CELKOVÉ SCHEMA

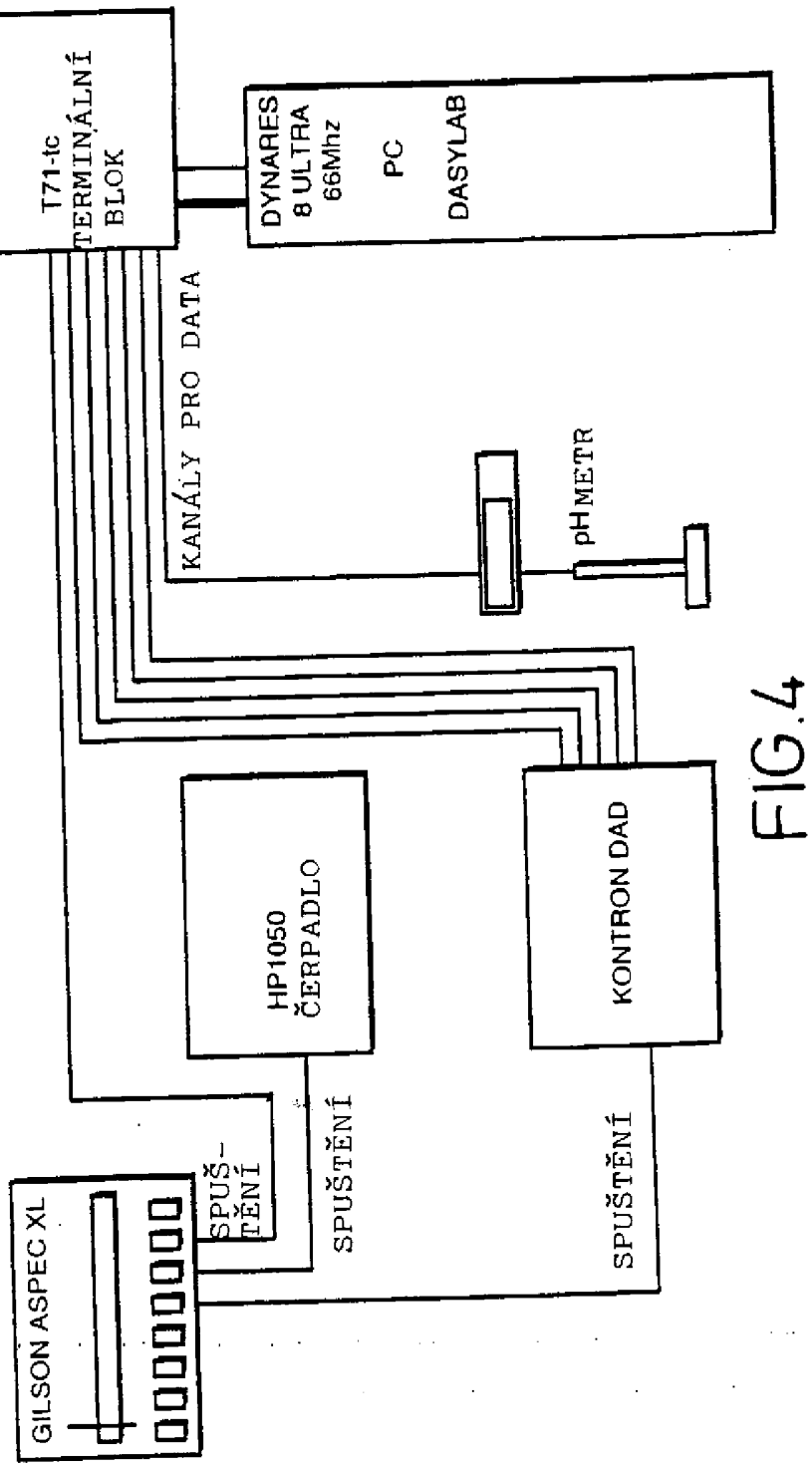


FIG.4

ELEKTRICKÉ PROPOJENÍ 2: SCHEMA SPOUŠTĚNÍ

GILSON XL - VÝSTUPY Z RELÉ

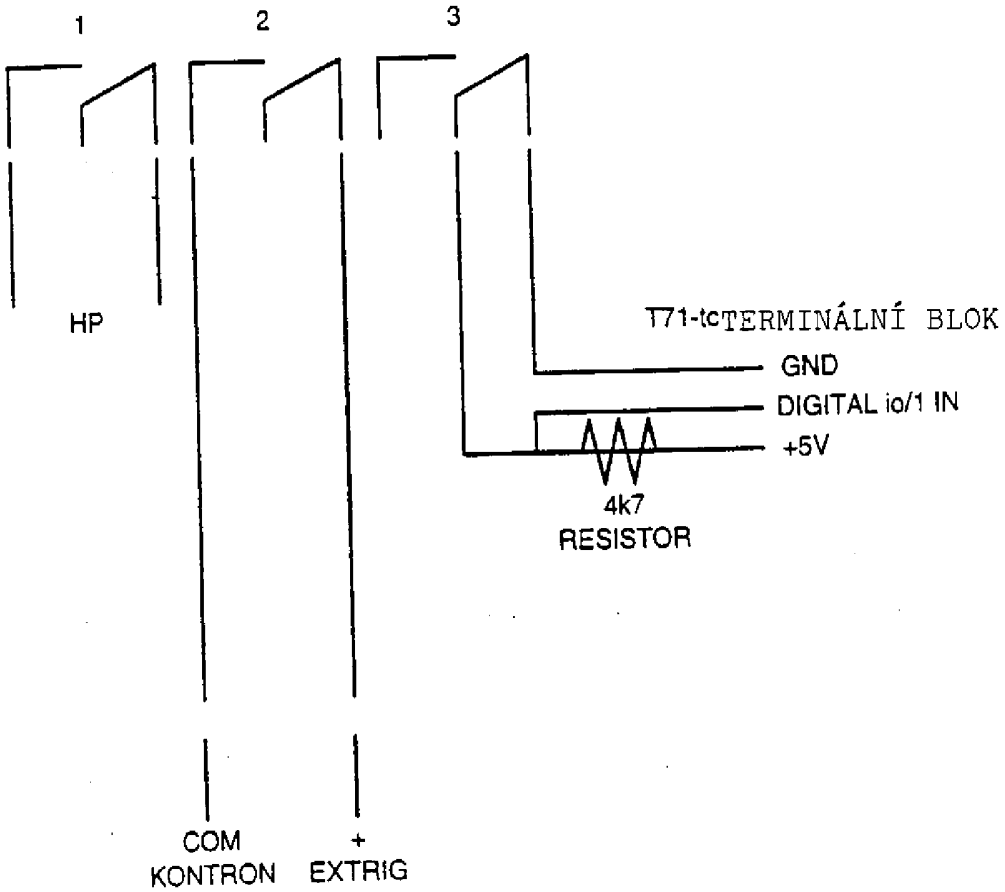


FIG.5

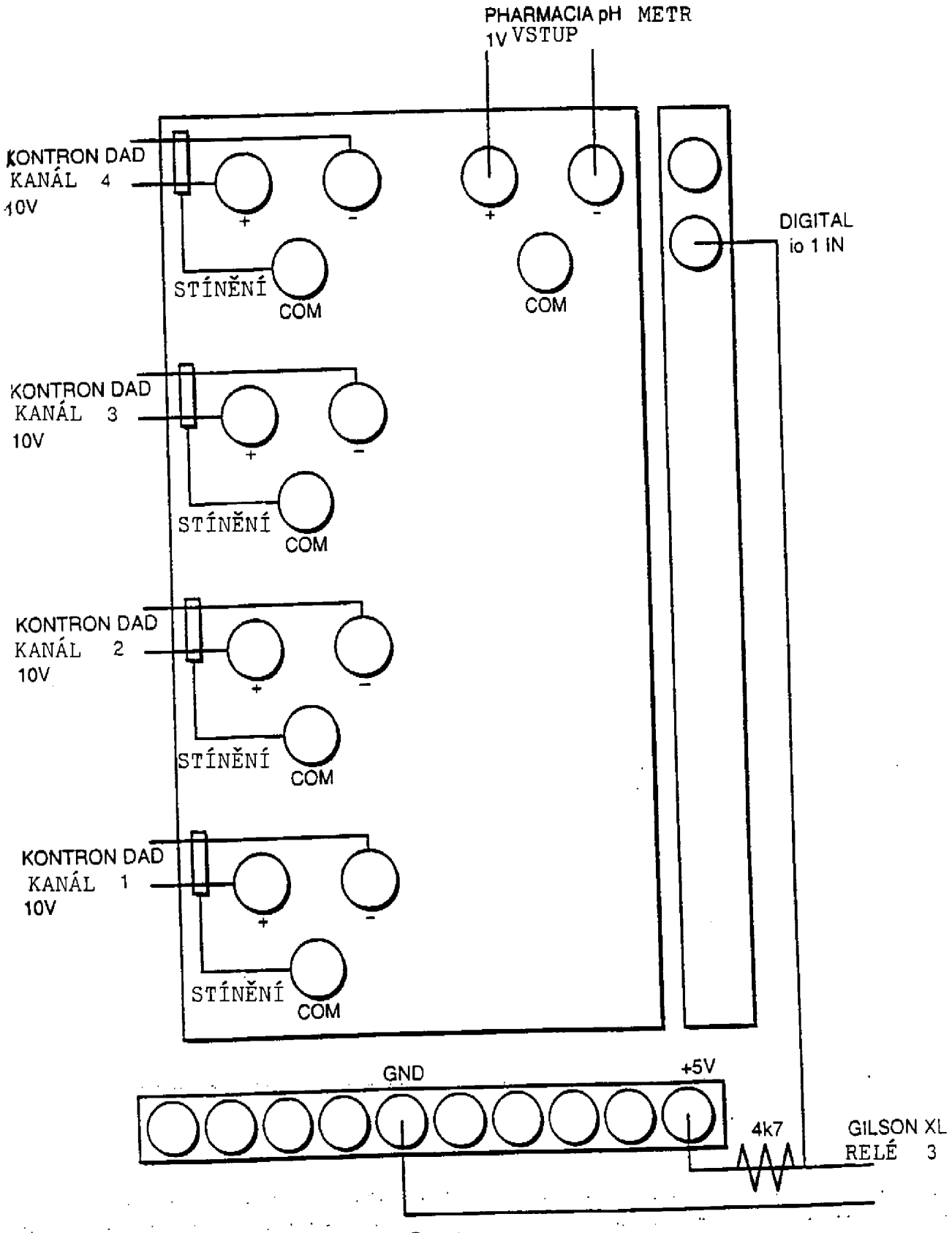

PHARMACIA pH METR
1V VSTUP
KONTRON DAD
KANÁL 4
10V
STÍNĚNÍ
COM
COM
DIGITAL
io 1 IN
KONTRON DAD
KANÁL 3
10V
STÍNĚNÍ
COM
KONTRON DAD
KANÁL 2
10V
STÍNĚNÍ
COM
KONTRON DAD
KANÁL 1
10V
STÍNĚNÍ
COM
GND
+5V
4k7
GILSON XL
RELÉ 3

FIG.6

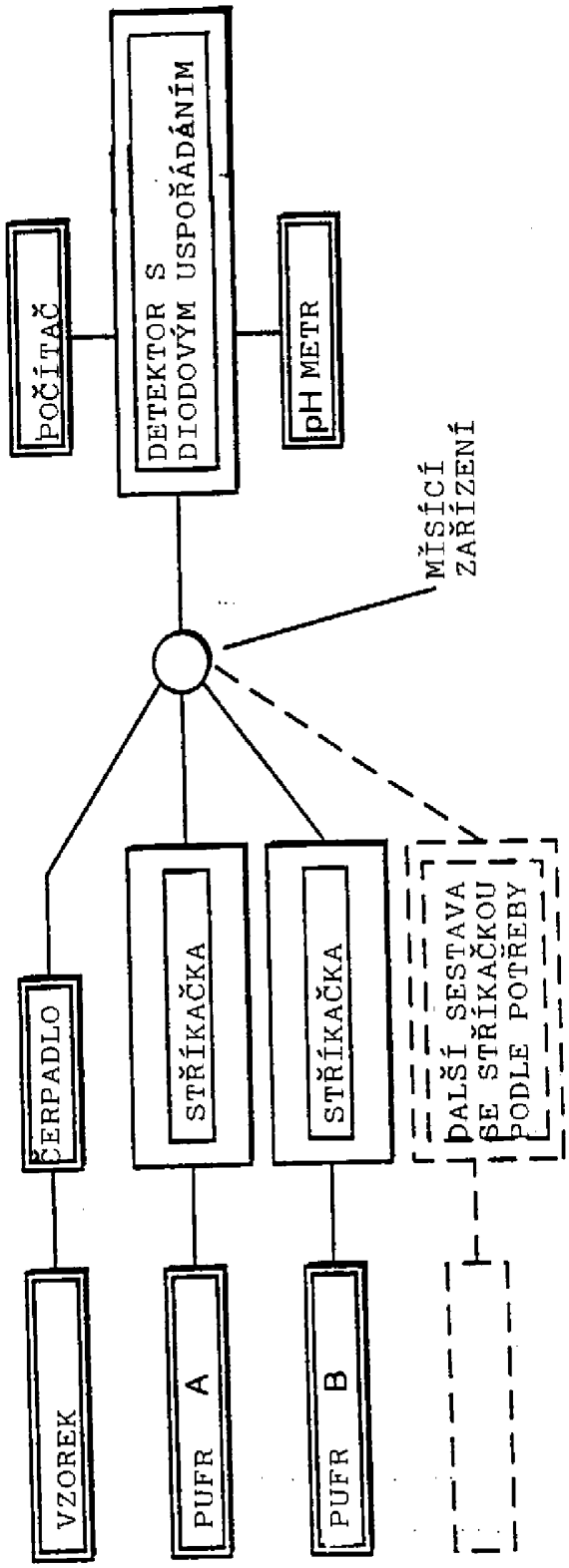

POČÍTAČ
DETEKTOR S DIODOVÝM USPOŘÁDÁNÍM
pH METR
MÍSÍCÍ ZAŘÍZENÍ
ČERPADLO
STŘÍKAČKA
STŘÍKAČKA
DALŠÍ SESTAVA SE STŘÍKAČKOU PODLE POTŘEBY
VZOREK
PUFR A
PUFR B

FIG.7

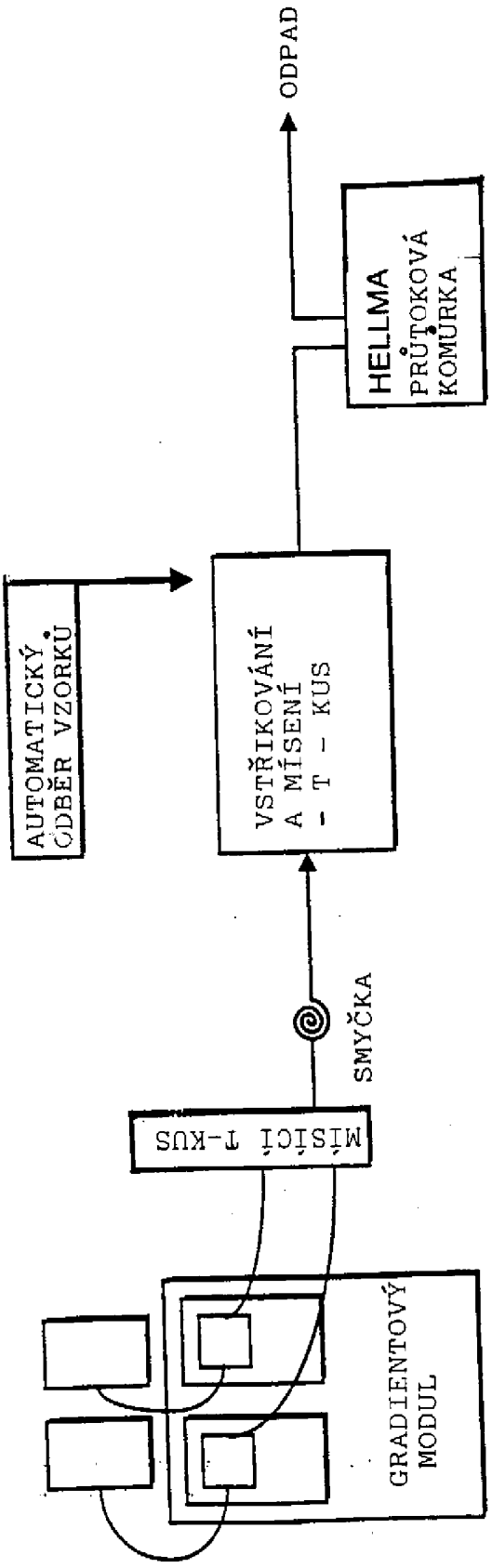

ODPAD
HELLMA
PRŮTOKOVÁ
KOMŮRKA
AUTOMATICKÝ
ODBĚR VZORKŮ
VSTŘIKOVÁNÍ
A MÍSENÍ
- T - KUS
SMYČKA
MÍSIČÍ T-KUS
GRADIENTOVÝ
MODUL

FIG.8

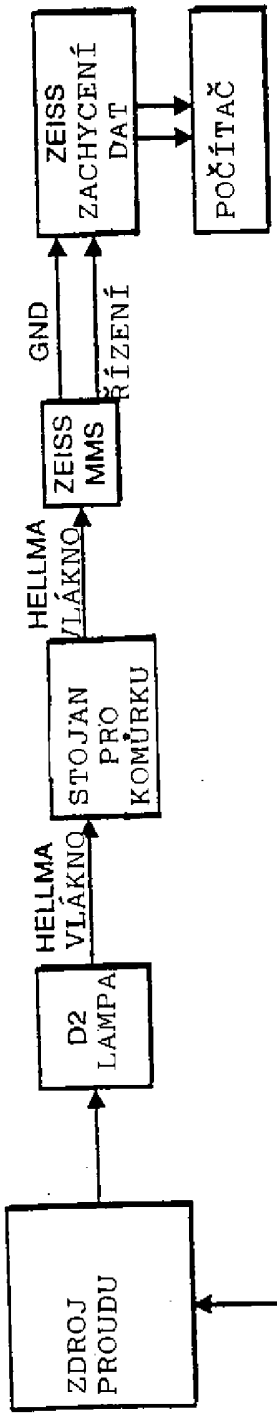

ZDROJ PROUDU
SPOUŠTĚCÍ POVEL Z POČÍTAČE
D2 LAMPA
HELLMA VLÁKNO
STOJAN PRO KOMŮRKU
HELLMA VLÁKNO
ZEISS MMS
GND
ŘÍZENÍ
ZEISS ZACHYCENÍ DAT
POČÍTAČ

FIG.9

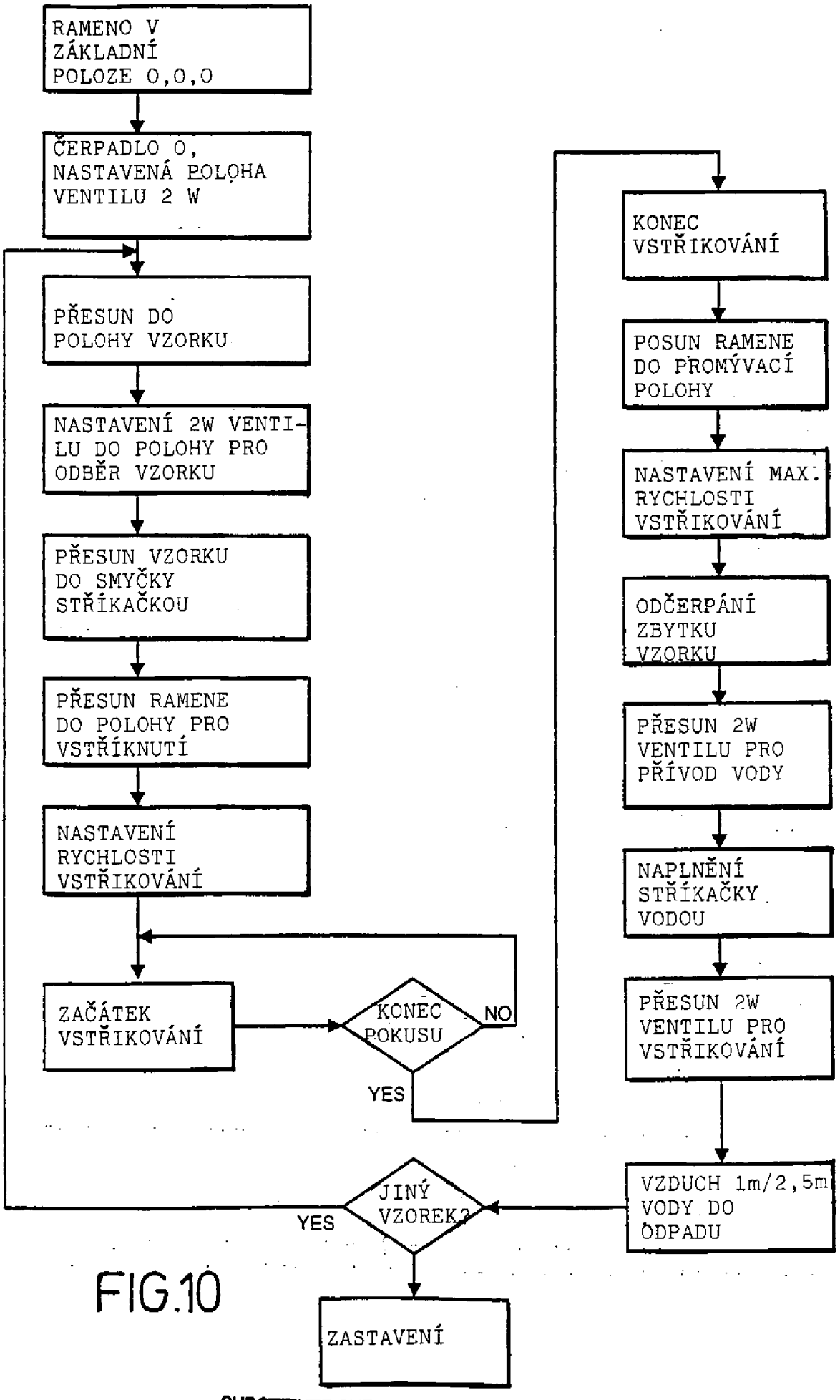

RAMENO V ZÁKLADNÍ POLOZE 0,0,0
ČERPADLO 0, NASTAVENÁ POLOHA VENTILU 2 W
PŘESUN DO POLOHY VZORKU
NASTAVENÍ 2W VENTILU DO POLOHY PRO ODBĚR VZORKU
PŘESUN VZORKU DO SMYČKY STŘÍKAČKOU
PŘESUN RAMENE DO POLOHY PRO VSTŘÍKNUTÍ
NASTAVENÍ RYCHLOSTI VSTŘIKOVÁNÍ
ZAČÁTEK VSTŘIKOVÁNÍ
KONEC POKUSU
NO
YES
KONEC VSTŘIKOVÁNÍ
POSUN RAMENE DO PROMÝVACÍ POLOHY
NASTAVENÍ MAX. RYCHLOSTI VSTŘIKOVÁNÍ
ODČERPÁNÍ ZBYTKU VZORKU
PŘESUN 2W VENTILU PRO PŘÍVOD VODY
NAPLNĚNÍ STŘÍKAČKY VODOU
PŘESUN 2W VENTILU PRO VSTŘIKOVÁNÍ
VZDUCH 1m/2,5m VODY DO ODPADU
JINÝ VZOREK?
YES
ZASTAVENÍ

FIG.10

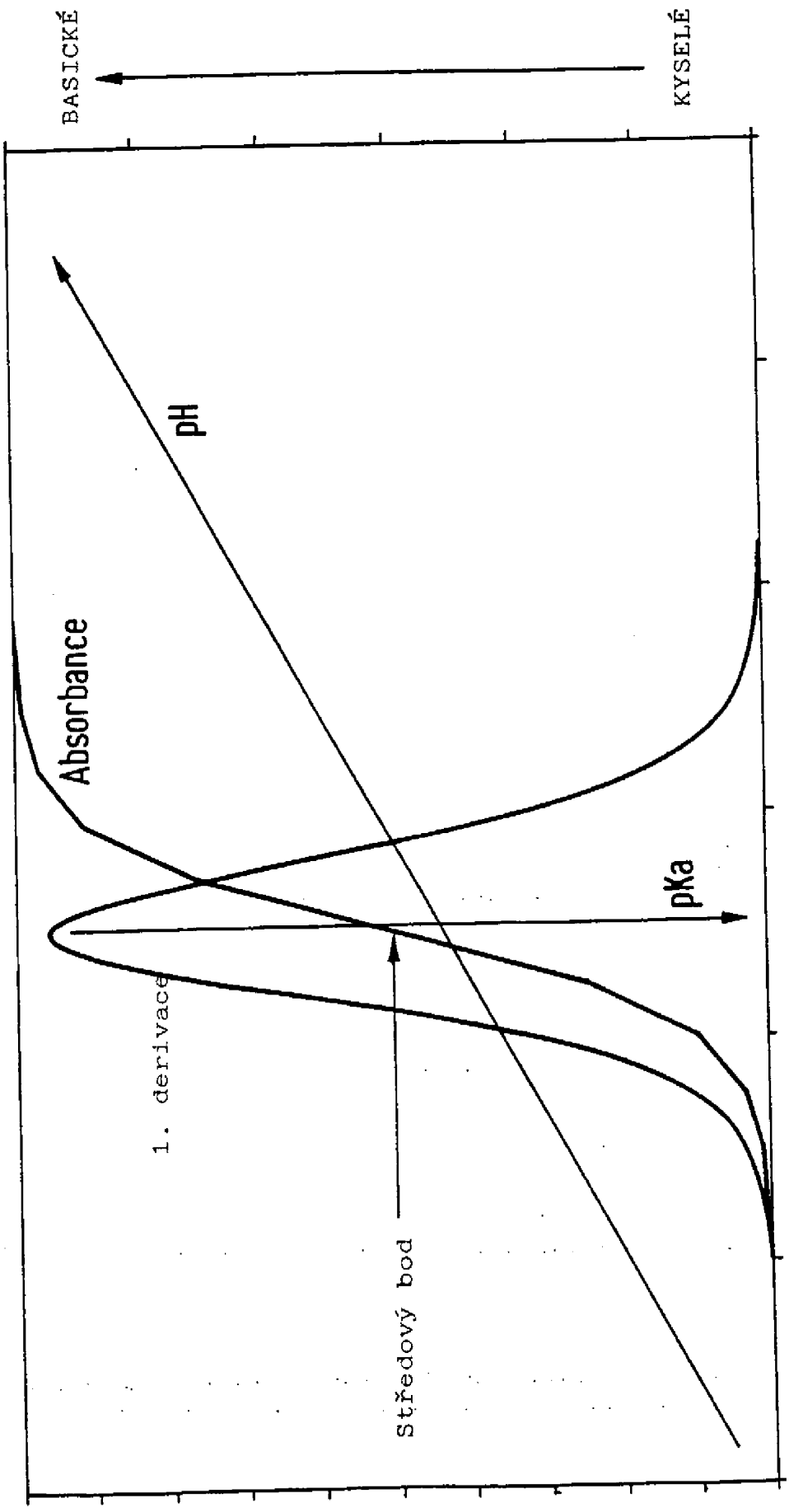

BASICKÉ
KYSELÉ
pH
Absorbance
pKa
1. derivace
Středový bod
Čas

FIG.11

Kalibrační křivka
10
9
8
7
6
5
4
3
λ
210
260
310
360
410
X
Standardisované hodnoty
1.50
1.00
0.50
0.00
-0.50
-1.00
-1.50
-2.00
210
310
410
X

FIG. 12

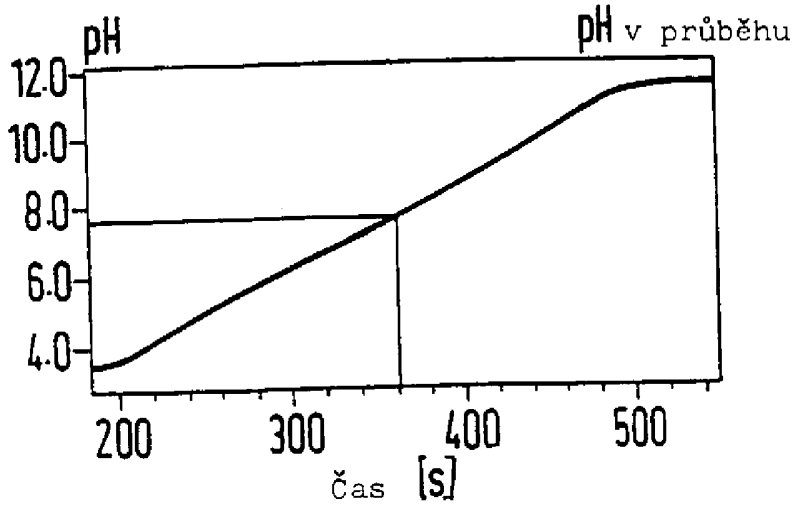


FIG.13

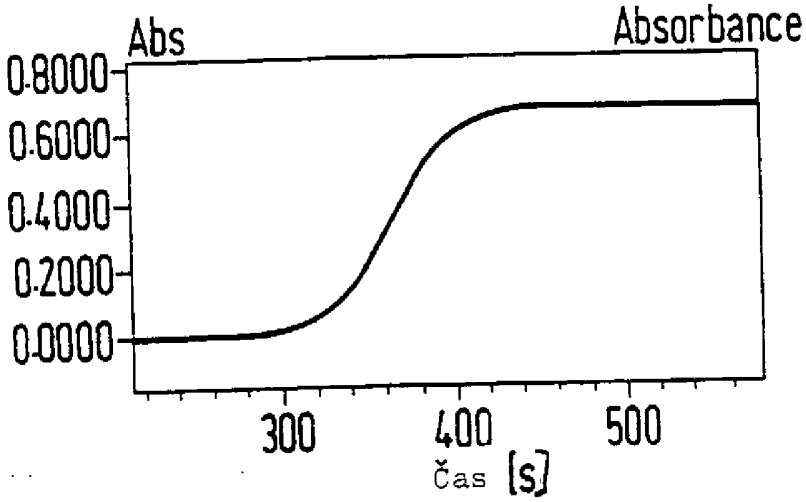


FIG.14

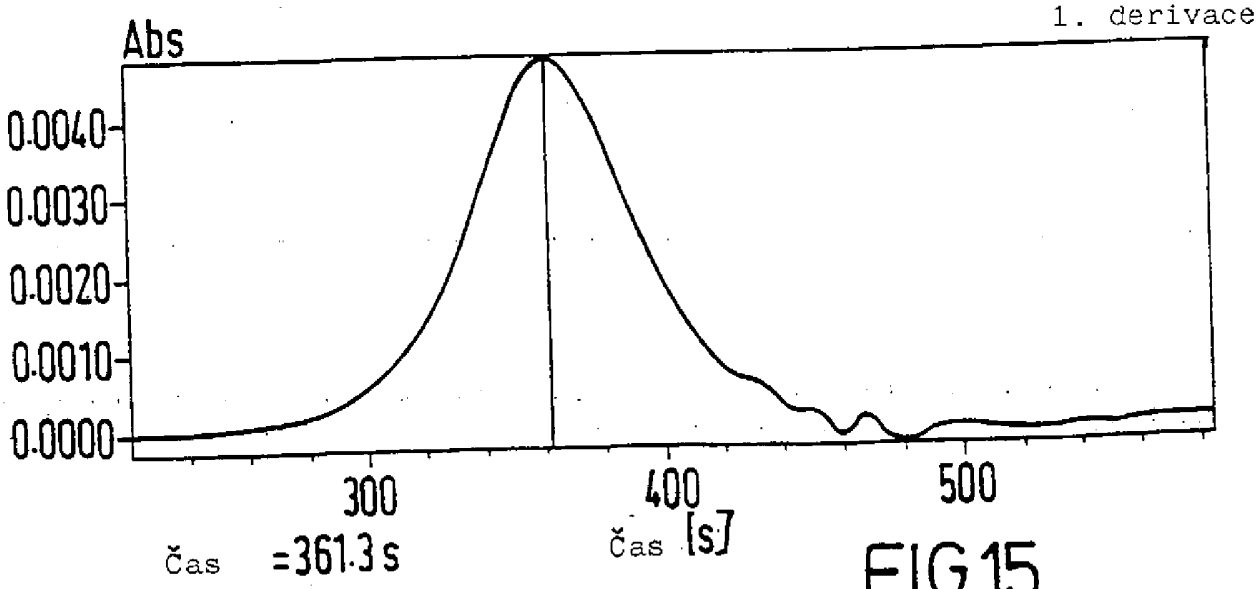


FIG.15

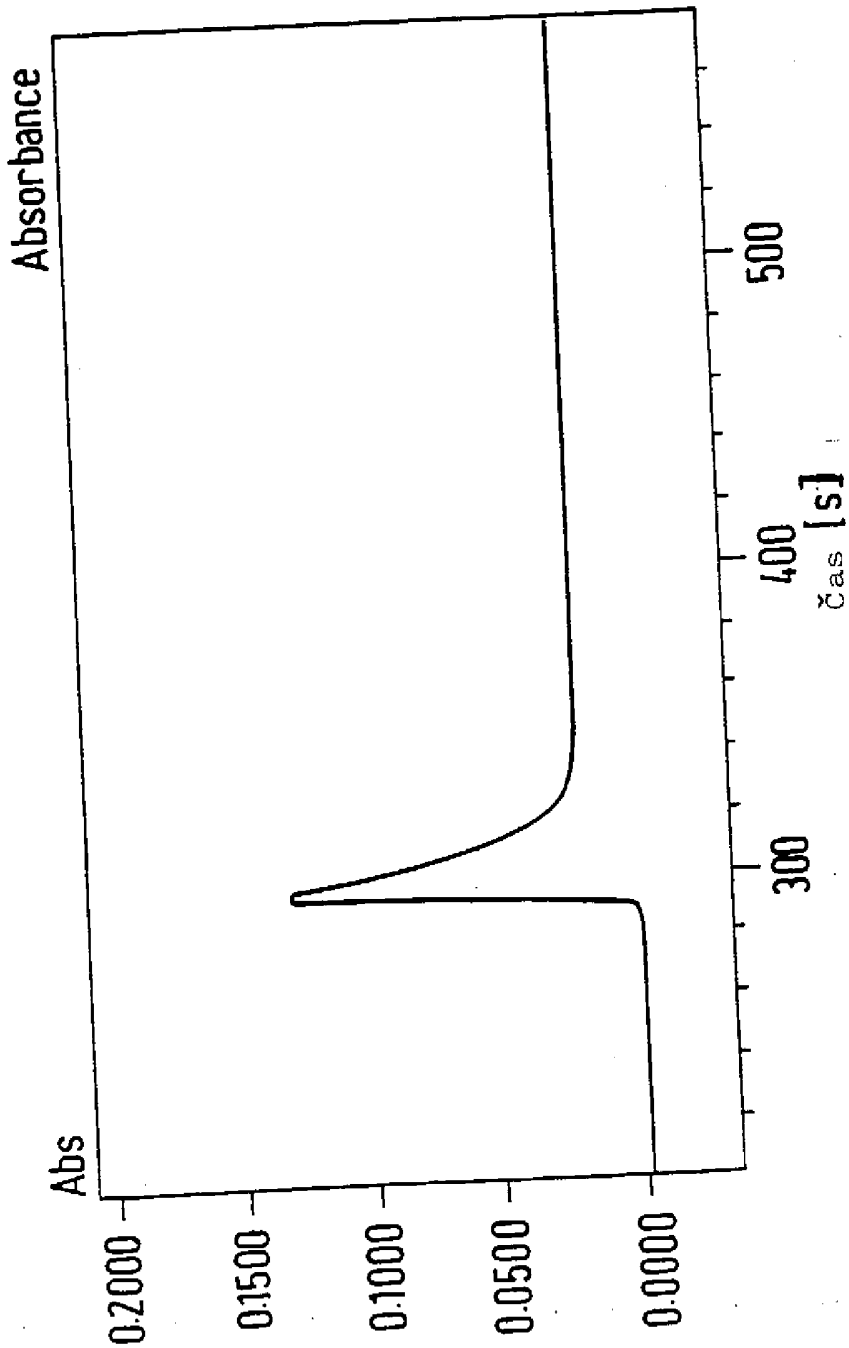
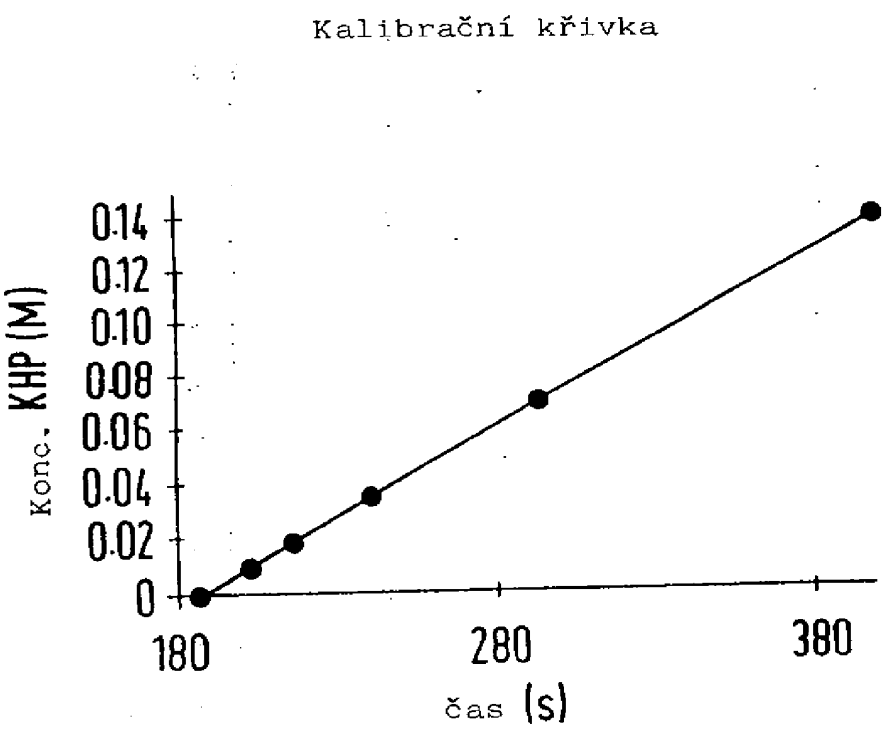


FIG:16 Křivka absorbance pro koncový bod titrace ($KHP_{při}$ 240nm)



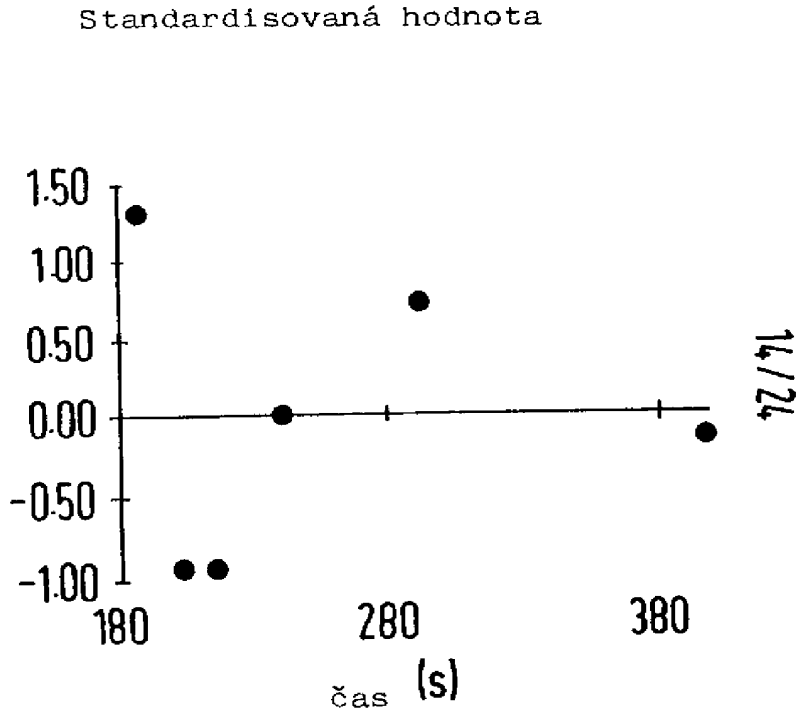


FIG.17

PV 2000 - 876

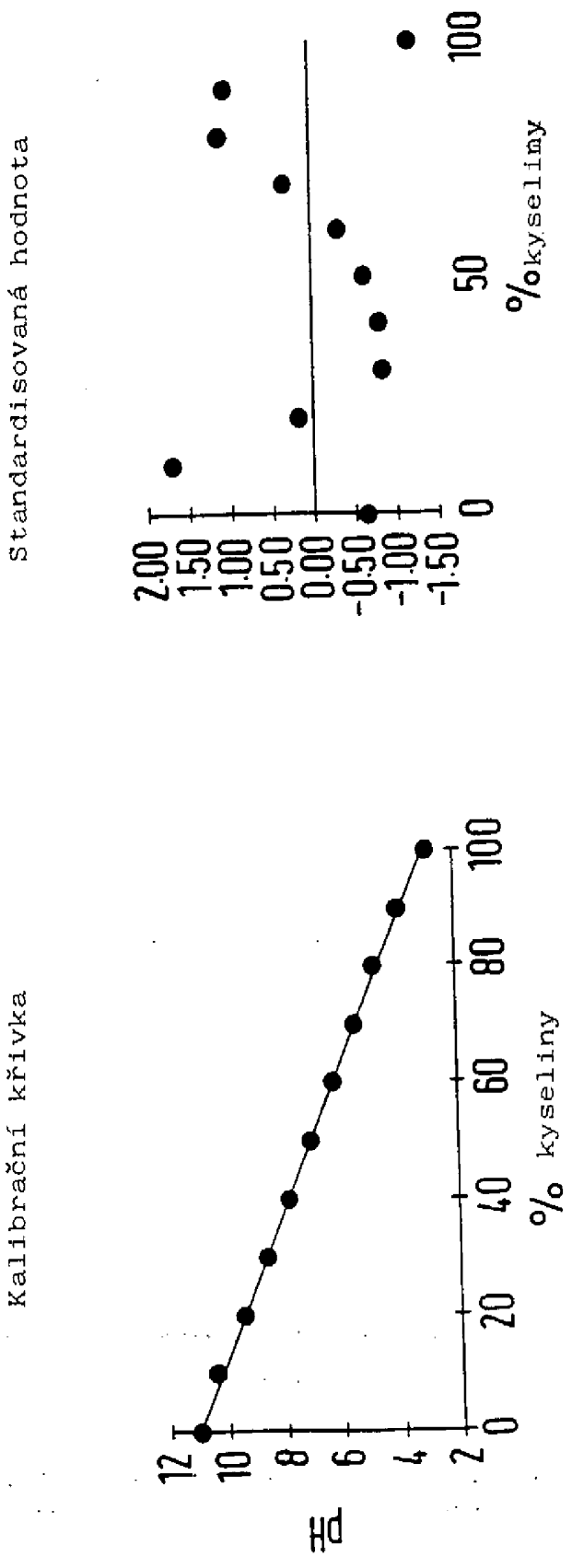

Kalibrační křivka
pH
12
10
8
6
4
2
0
20
40
60
80
100
% kyseliny
Standardisovaná hodnota
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
-0.50
-1.00
-1.50
0
50
100
%kyseliny

FIG.18

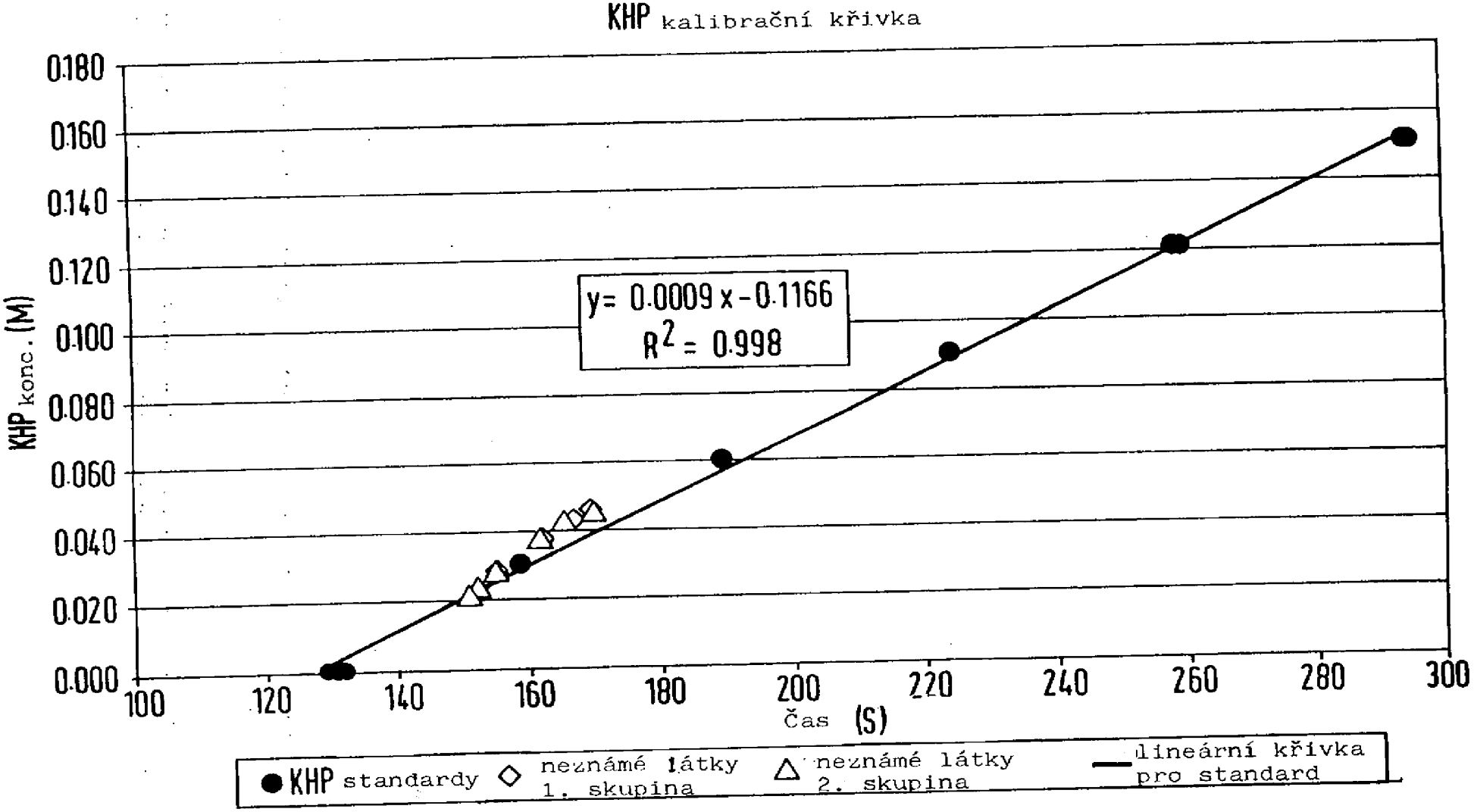


FIG.19

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2000 - 878

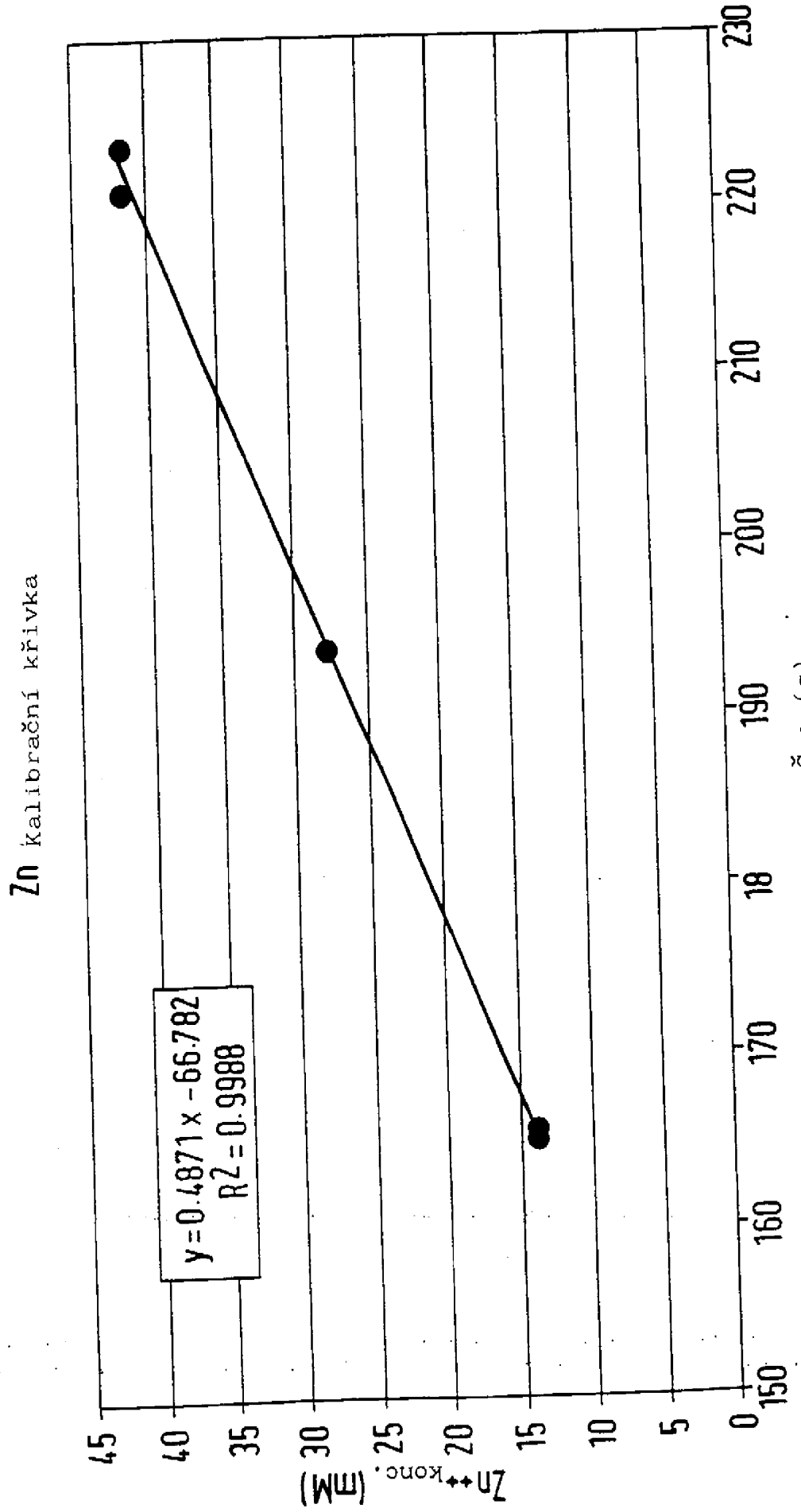

Zn Kalibrační křivka
y=0.4871x-66.782
R2=0.9988
Zn++kono. (mM)
Čas (s)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
150
160
170
180
190
200
210
220
230

FIG. 20

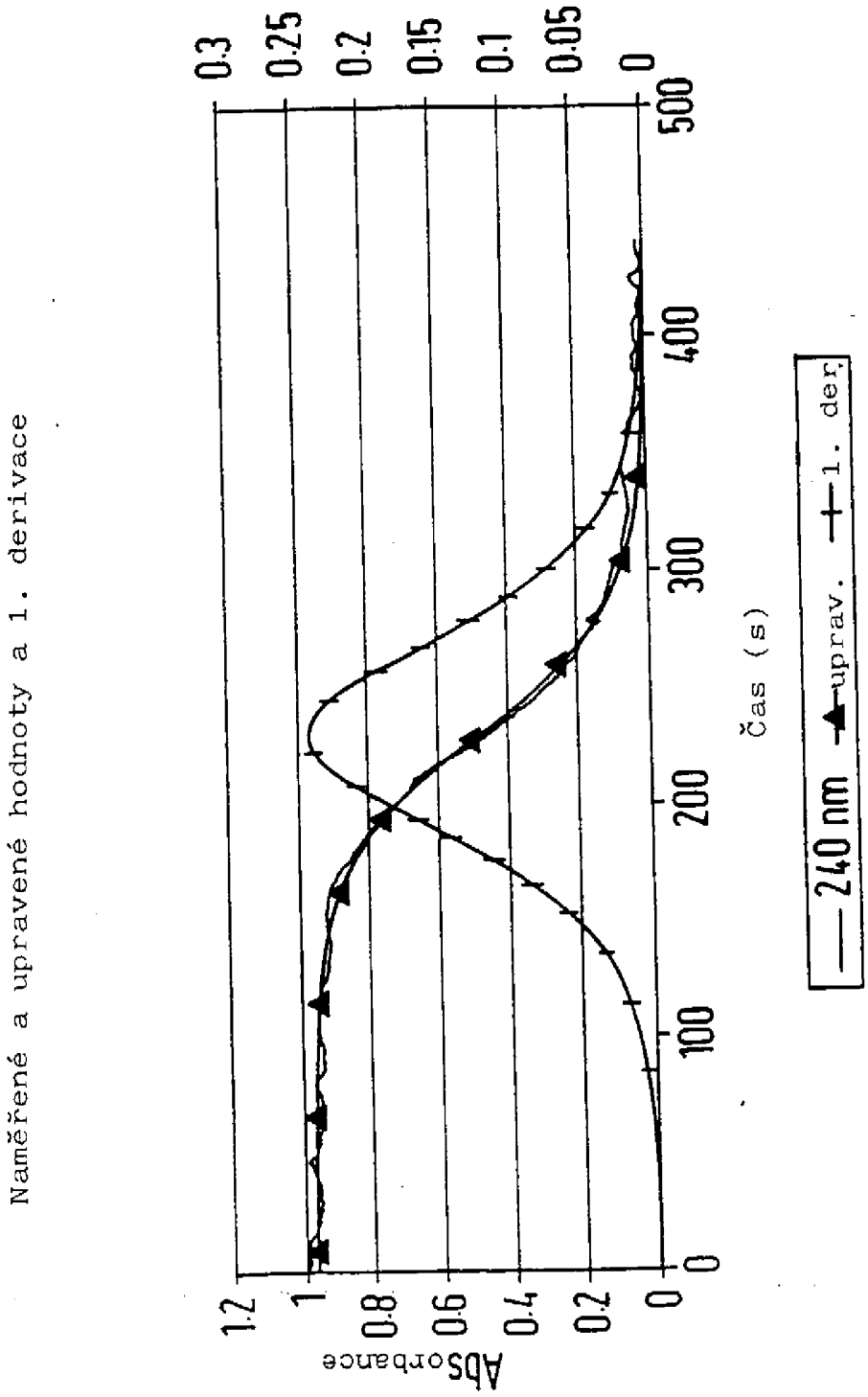

Naměřené a upravené hodnoty a 1. derivace
Absorbance
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
500
400
300
200
100
0
Čas (s)
240 nm
uprav.
1. der.

FIG.21

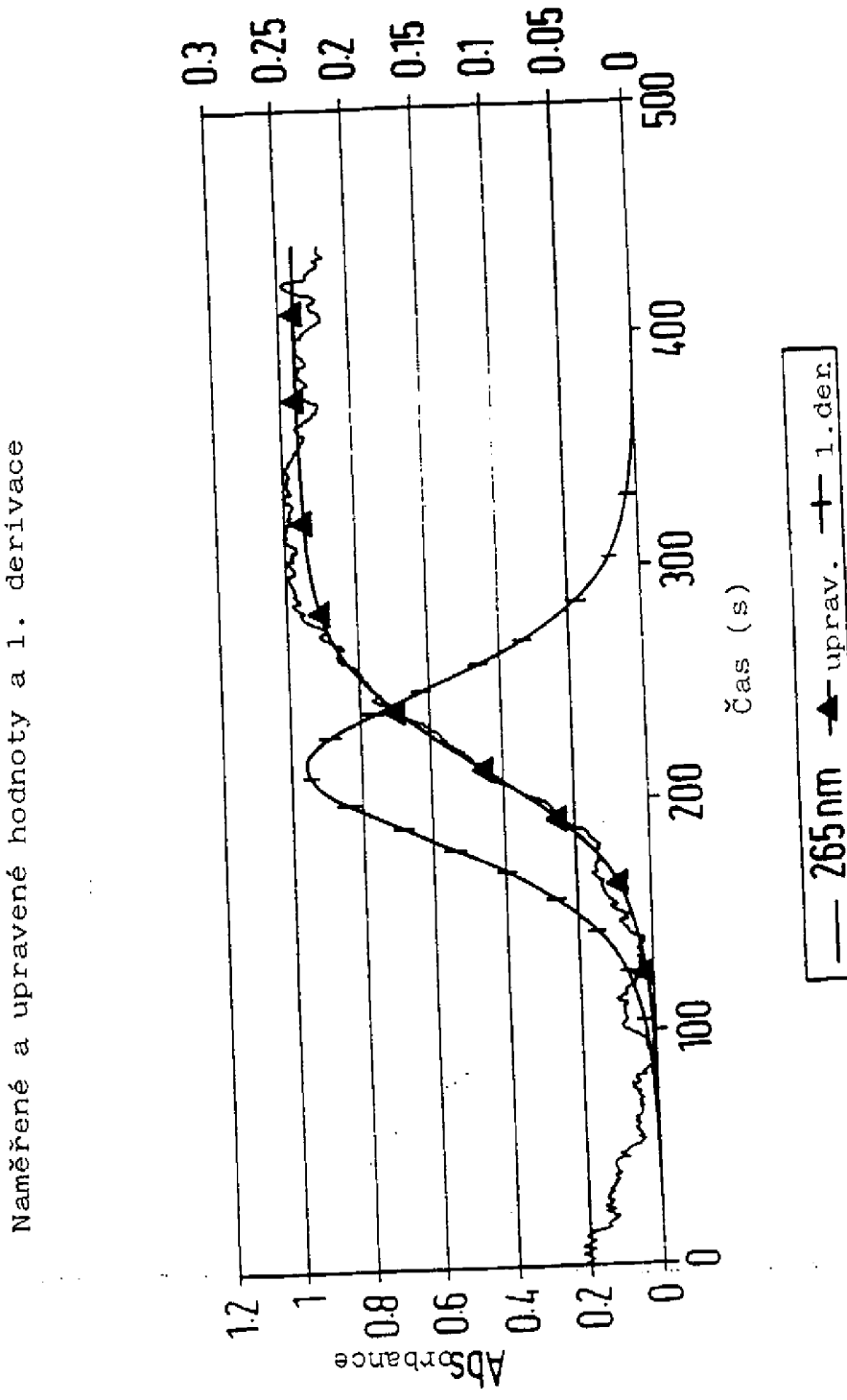

Naměřené a upravené hodnoty a 1. derivace
Absorbance
Čas (s)
265nm
uprav.
1.der.

FIG.22

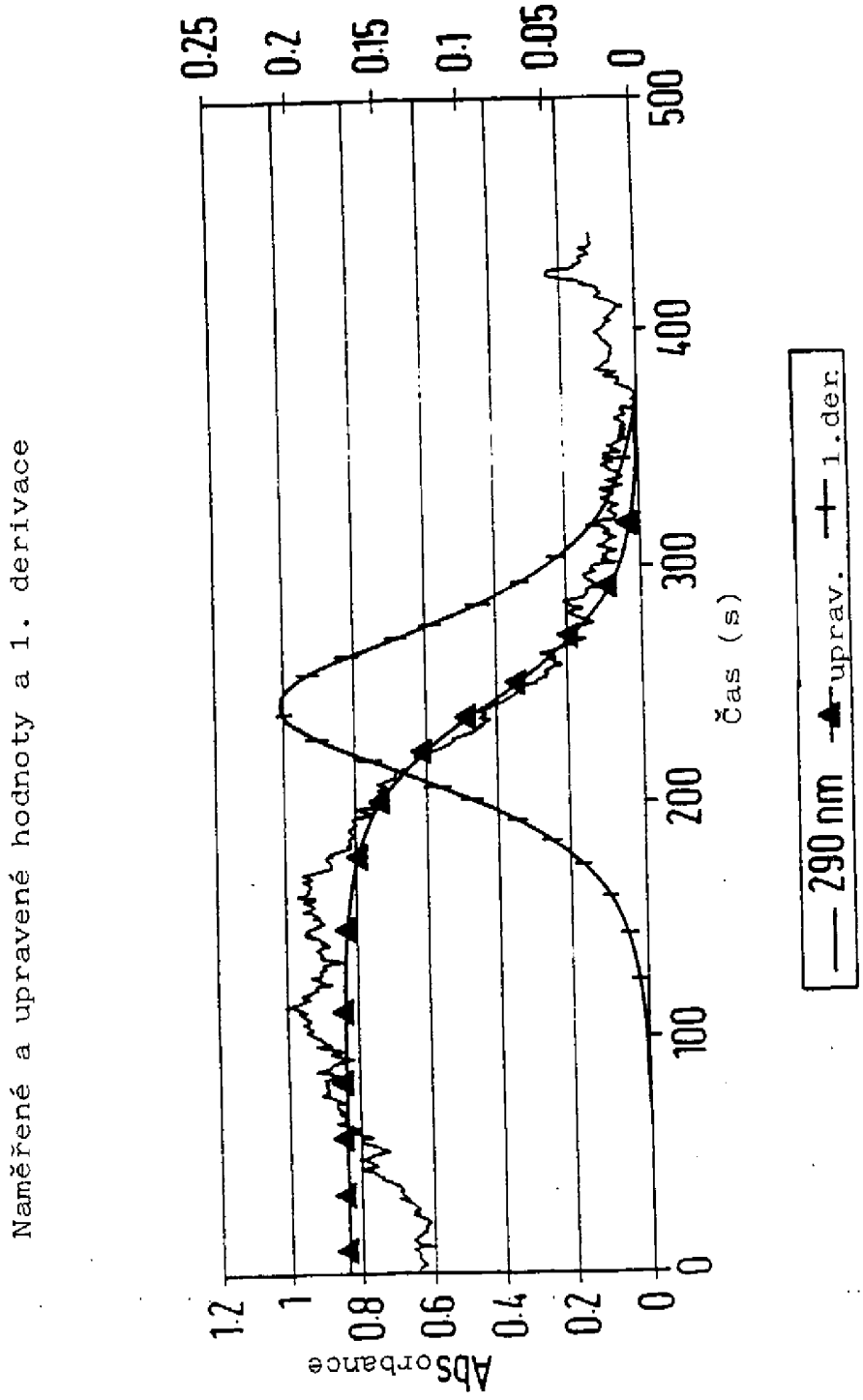

Naměřené a upravené hodnoty a 1. derivace
Absorbance
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
500
400
300
200
100
0
Čas (s)
290 nm
uprav.
1.der

FIG. 23

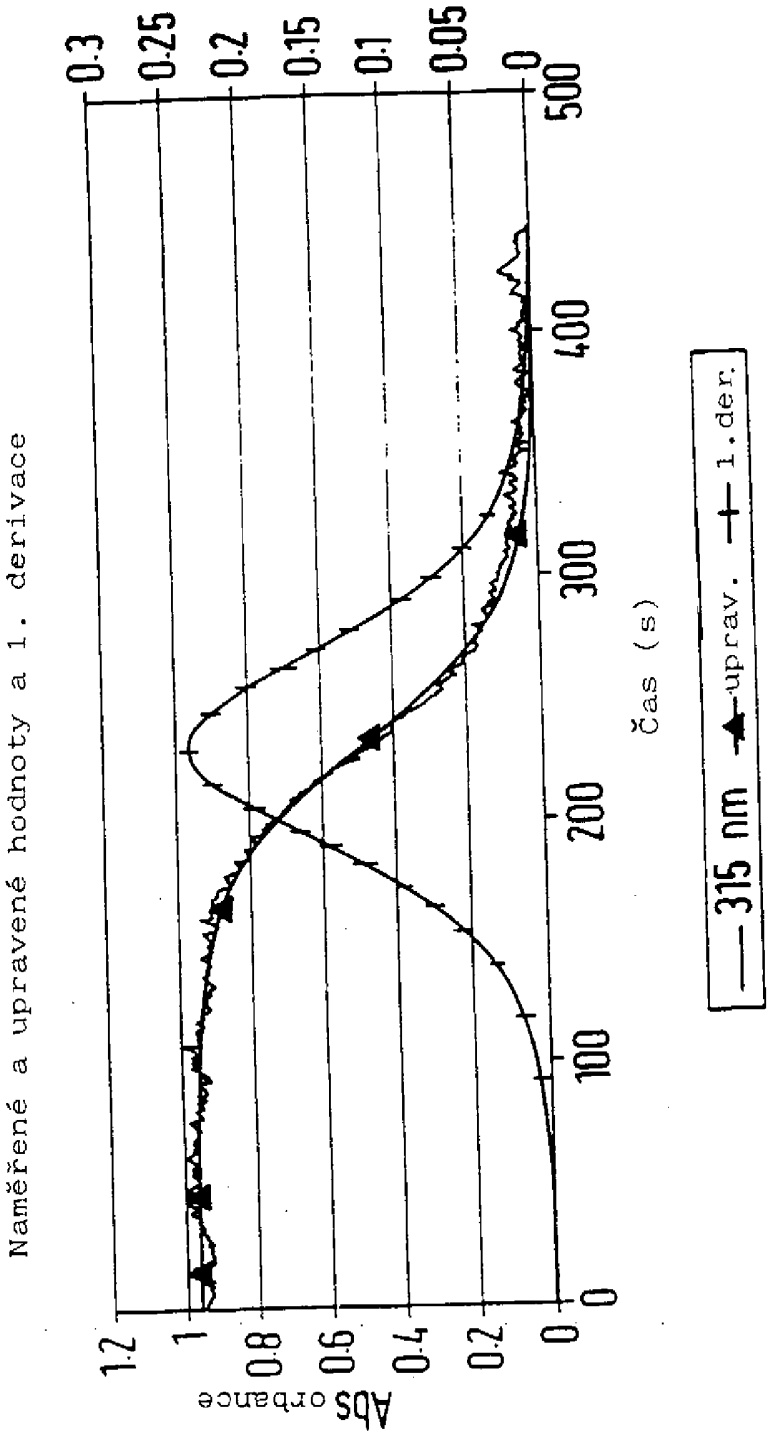

Naměřené a upravené hodnoty a 1. derivace
Abs orbance
Čas (s)
315 nm
uprav.
1.der.
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
500
400
300
200
100
0
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0

FIG.24

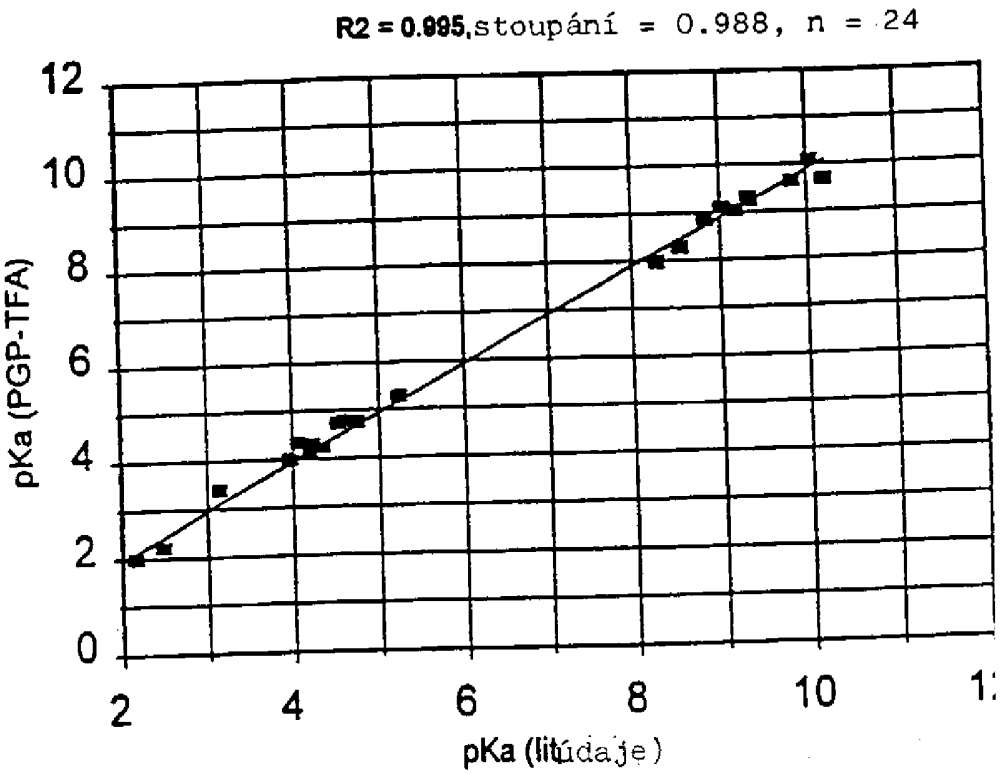

R2 = 0.995, stoupání = 0.988, n = 24
pKa (PGP-TFA)
pKa (lit údaje)
0
2
4
6
8
10
12
2
4
6
8
10

FIG.25

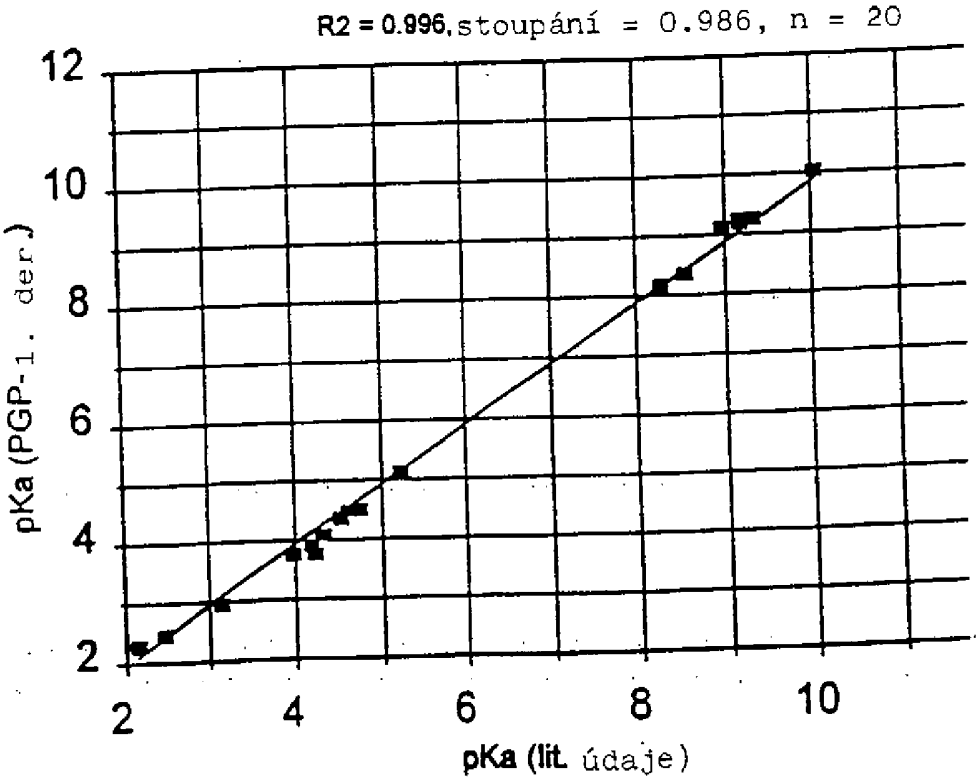

R2 = 0.996, stoupání = 0.986, n = 20
pKa (PGP-1. der.)
pKa (lit. údaje)
2
4
6
8
10
12
2
4
6
8
10

FIG.26

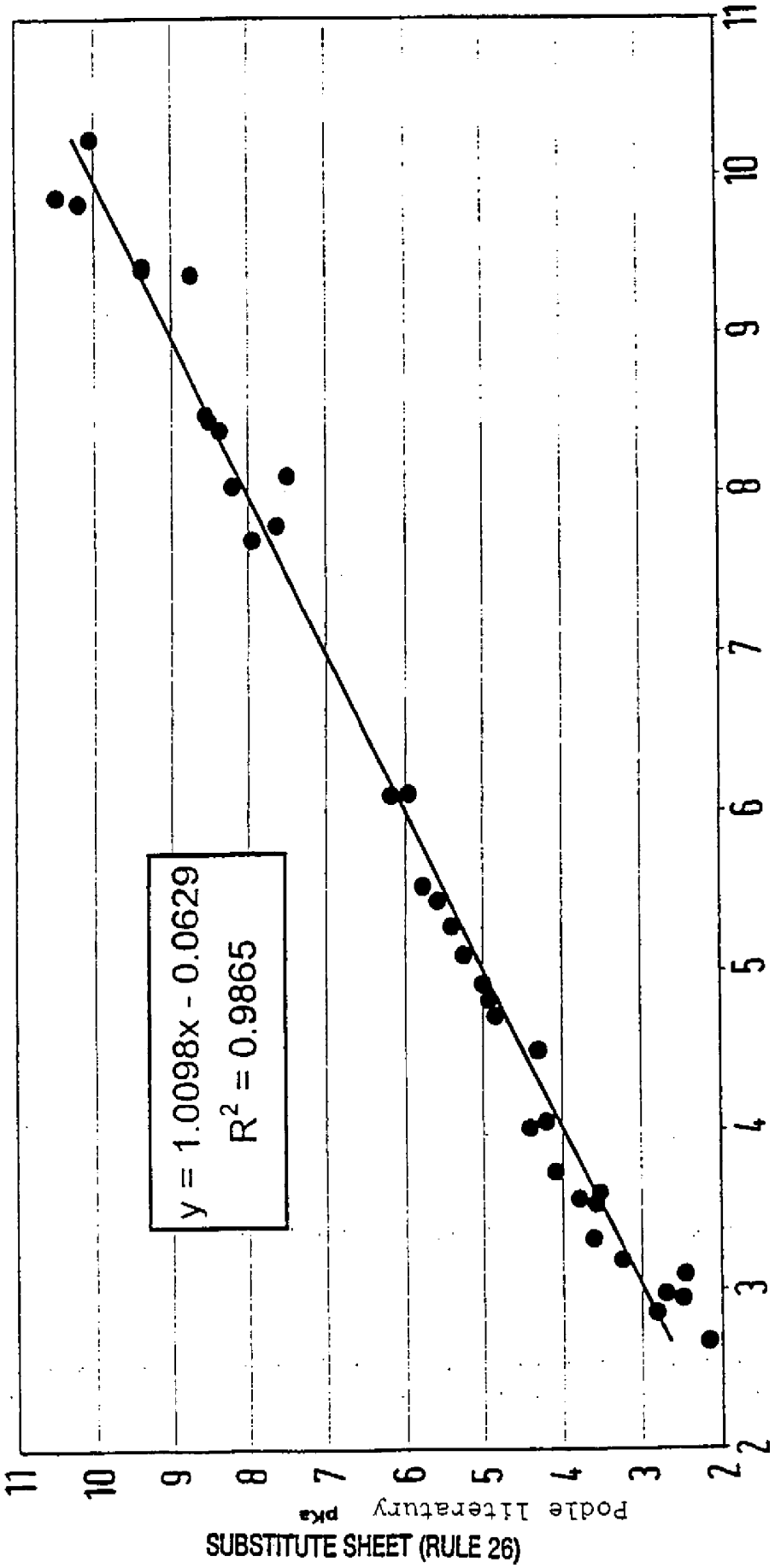

y = 1.0098x - 0.0629
R² = 0.9865
Poole literature pKa
PGP pKa
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2

FIG.27

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Profily absorbance v nepřítomnosti (Abs) a v přítomnosti (abs part) dělicího prostředí

kyselina: Ai=1, Au=0.2 logP=3.5
Delta=3.5, pKa=4 ch=-1

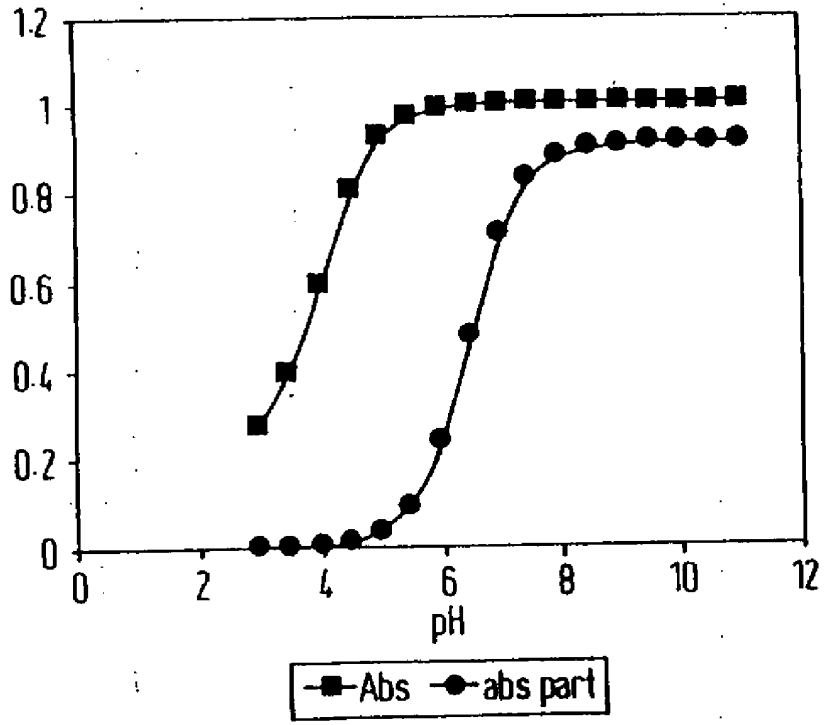


FIG.28

Profily absorbance v nepřítomnosti (Abs) a v přítomnosti (abs part) dělicího prostředí:

Base1: Ai=1, Au=0, logP=3.5
Delta=3.5, pKa=10 ch=1

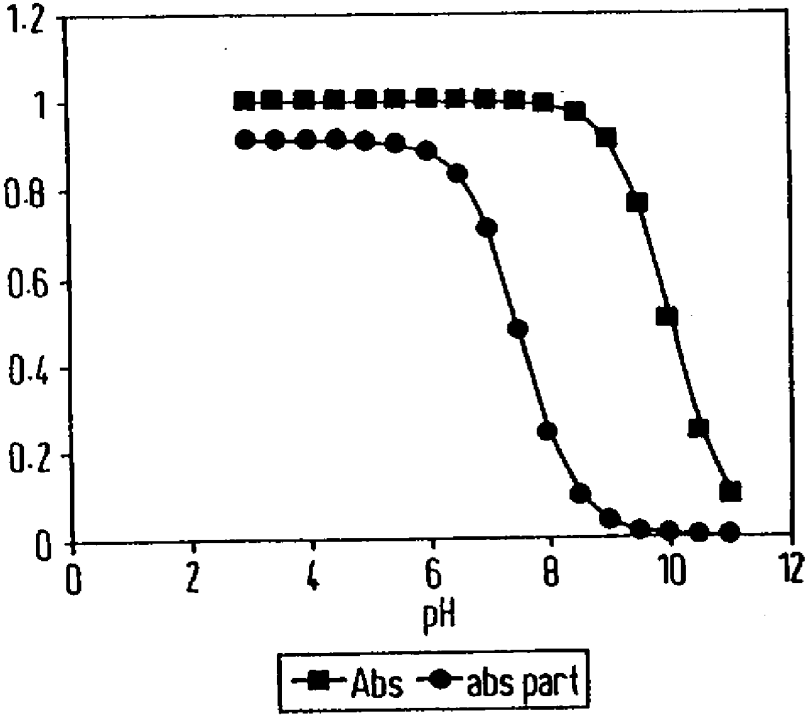


FIG.29

PV 2000 - 876